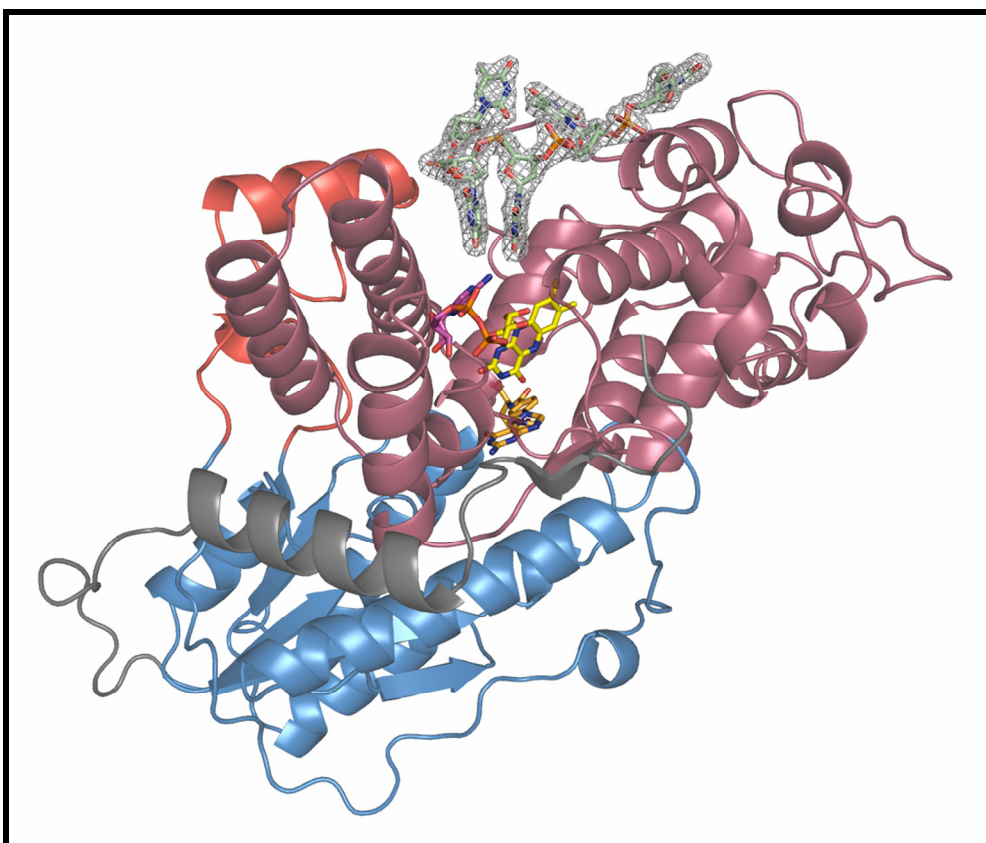


# **Strukturelle Aufklärung und funktionelle Charakterisierung der DNA-Reparaturprozesse in DNA-Photolyasen und Cryptochrom 3**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)



dem  
Fachbereich Chemie  
der  
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
**Tobias Klar**  
aus Bruchköbel  
Marburg/Lahn 2007









# **Strukturelle Aufklärung und funktionelle Charakterisierung der DNA-Reparaturprozesse in DNA-Photolyasen und Cryptochrom 3**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Tobias Klar**

aus Bruchköbel

Marburg/Lahn 2007



Vom Fachbereich Chemie  
der Philipps-Universität Marburg  
als Dissertation am 13. November 2007 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Lars-Oliver Essen (Fachbereich Chemie, Marburg)  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Alfred Batschauer (Fachbereich Biologie, Marburg)

Tag der Disputation: 05. Dezember 2007



## Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Thema:

**"Strukturelle Aufklärung und funktionelle Charakterisierung der  
DNA-Reparaturprozesse in DNA-Photolyasen und Cryptochrom 3"**

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als den von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, 01. Oktober 2007

---



*für Ursula und Reinhard*





„Es gibt kein größeres Hindernis des Fortgangs in den Wissenschaften als das Verlangen, den Erfolg davon zu früh verspüren zu wollen.“

Georg Christoph Lichtenberg  
(dt. Schriftsteller und Physiker)



Ein Teil der vorliegenden Arbeit wurde bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

- Alexandra Mees, **Tobias Klar**, Petra Gnau, Ulrich Hennecke, André P. M. Eker, Thomas Carell, Lars-Oliver Essen (2004)  
*Crystal Structure of a Photolyase Bound to a CPD-Like DNA Lesion After in Situ Repair.*  
Science, 306, 1789-1793.
- Richard Pokorny, **Tobias Klar**, Lars-Oliver Essen, Alfred Batschauer (2005)  
*Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of Cryptochrome 3 from Arabidopsis thaliana*  
Acta Crystallogr. F, 61(10), 935-938.
- **Tobias Klar**, Gebhard Kaiser, Ulrich Hennecke, Thomas Carell, Alfred Batschauer, Lars-Oliver Essen (2006)  
*Natural and Non-natural Antenna Chromophores in the DNA Photolyase from Thermus thermophilus.*  
ChemBioChem, 7(11), 1798-1805.
- **Tobias Klar**, Richard Pokorny, Julia Moldt, Alfred Batschauer, Lars-Oliver Essen (2007)  
*Cryptochrome 3 from Arabidopsis thaliana: Structural and Functional Analysis of its Complex with a Folate Light Antenna.*  
J. Mol. Biol., 366(3), 954-964.

Weitere Publikationen:

- Lars-Oliver Essen, **Tobias Klar** (2006)  
*Light-driven DNA repair by photolyases.*  
Cell. Mol. Life Sci., 63(11), 1266-1277.



## Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Leuten herzlich bedanken, die auf viele unterschiedliche Weisen mit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2003 bis September 2007 am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg in der Abteilung für Strukturelle Biochemie unter der Leitung von Prof. Dr. Lars-Oliver Essen angefertigt. Meinem Doktorvater gilt mein besonderer Dank für die Möglichkeit zur Bearbeitung des überaus interessanten, aktuellen und vielschichtigen Themenkomplexes. Weiterhin für die intensive Förderung und immer gewährte Unterstützung meiner Arbeit durch seine wissenschaftliche Kompetenz, insbesondere bei Fragestellungen in Bezug auf kristallographische Probleme sowie seine ständige Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft, die entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Prof. Dr. Alfred Batschauer möchte ich mich für das Ermöglichen der engen und sehr produktiven Zusammenarbeit mit den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe und die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens herzlich bedanken.

Gebhard Kaiser, Julia Moldt und Dr. Richard Pokorný danke ich für die herzliche Aufnahme in die pflanzenphysiologische Arbeitsgruppe am Fachbereich Biologie und ihre Arbeiten mit mir an der schwierigen Ausarbeitung des ELISA-Tests bzw. den umfangreichen Experimenten mit Cry3. Weiterhin bin ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Batschauer verbunden für ihre Einladungen zur Erkundung der Lahn auf mehreren unterhaltsamen und reizvollen Kanutouren.

Dr. Ulrich Hennecke, der einen Großteil der verwendeten Flavinanaloga und Oligomere synthetisiert und zur Verfügung gestellt hat, danke für die konstruktive Zusammenarbeit und viele fruchtbare wissenschaftliche Diskussionen rund um Flavine.

Dr. Alexandra Mees danke ich für die Bereitstellung der von ihr synthetisierten CPD-haltigen Oligomere und des 8-HDF.

Bei Annette Brunsen und Dr. Tiago Buckup bedanke ich mich für die geduldige Einführung in die Geheimnisse und Tücken der Ultrakurzzeitspektroskopie.

Prof. Dr. André P. M. Eker von der Erasmus Universität Rotterdam danke ich für die Überexpression der *A. nidulans* Photolyase und deren Rekonstitution mit 8-HDF.

Dr. Paul Tucker, Dr. Andrea Schmidt und Dr. Matthew Groves vom EMBL Hamburg sage ich Danke für die sehr professionelle Betreuung bei den durchgeführten Synchrotronexperimenten zu jeder Tageszeit.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Essen danke ich für die sehr angenehme, freundschaftliche Atmosphäre, die weit über das Labor hinausging, die gute Zusammenarbeit und ihre ständige Bereitschaft, mir bei jeglichen Fragen oder Schwierigkeiten mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Petra Gnau danke ich sehr herzlich für ihr offenes Ohr, ihre herzerfrischende, verständnisvolle und erheiternde Art.

Danke an Stefan Samel und seiner immer guten Laune, die er bisweilen mit einem einzigartigen mehrstimmigen Pfeifen zum Ausdruck bringt und dadurch in der Lage war, meine Stimmung in strapaziösen Situationen wieder aufzuhellen vermochte.

Dr. Louisa Tsougaraki, Daniel Kreß, Dr. Georgios Psakis, Manuel Maestre-Reyna, Jo Mailliet und Andreas Schönafinger gilt mein Dank für das gemeinsame Bestehen vieler geheimnisvoller Rollenspielabenteuer während langer Nächte als Vampir (*Arbitrium Vincit Omnia*).

Dr. Michael Raskop bin ich sehr dankbar für die Einführung in die Kunst des Snowboardens, viele nicht wissenschaftliche Stunden beim malträtieren eines unschuldigen Squashballs und darüber hinaus.

Allen derzeitigen und früheren Mitgliedern meiner Roverunden des Stamm Shalom Bruchköbel sage ich an dieser Stelle ein großes Dankeschön für das mir immer entgegengebrachte große Vertrauen, die zahlreichen, anregenden, sehr persönlichen Gespräche und aussergewöhnliche, spannende, ruhige oder hektische, aber niemals langweilige Aktionen und Fahrten.

Sämtlichen Aushilfen und hauptamtlichen Mitarbeitern des DRK Kreisverbands Hanau gebührt mein Dank für die während vieler Jahre erlebten spannenden Tage und Nächte im Rettungswagen sowie das überaus interessante Wachenleben.

Kathrin Fehlberg, Britta Meißner, Daniel Kreß und Robert Klar danke ich für die gewissenhafte Durchsicht dieses Manuskripts und ihre kritischen Anmerkungen.

Besonders danken möchte ich nicht zuletzt meiner Familie, die mit ihrer grenzenlosen Unterstützung nicht nur während der Promotionszeit immer hinter mir gestanden hat. Meinen Eltern Ursula und Reinhard sowie meinen drei Brüdern Felix, Andreas und Robert gebührt mein herzlichster Dank.







## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>Summary</b>	<b>3</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1. Schädigung der DNA durch UV-Strahlung	5
1.2. Cyclobutanpyrimidindimere und (6-4)Photoprodukte	6
1.3. DNA-Reparatursysteme	9
1.3.1. Nucleotidexcisionsreparatur (NER)	10
1.3.2. Basenexcisionsreparatur (BER)	11
1.3.3. Fehlpaarungsreparatur (MMR)	12
1.3.4. Homologe Rekombination (HR) und <i>End Joining</i> (EJ)	13
1.3.5. Photoreaktivierung	13
1.4. DNA-Photolyasen	14
1.4.1. Überblick	14
1.4.2. Der katalytische Cofaktor FAD	17
1.4.3. Photoantennen	18
1.4.4. Bekannte Kristallstrukturen	19
1.4.5. Reparaturmechanismus der DNA-Photolyase	22
1.4.6. Photoaktivierung	23
1.5. Cryptochrome	24
1.6. Zielsetzung und Motivation	27
<b>2. Material</b>	<b>29</b>
2.1. Geräte	29
2.2. Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Enzyme	31
2.3. Vektoren	33
2.4. Mikroorganismen	34
2.4.1. <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	34
2.4.2. <i>E. coli</i> XL1-Blue Superkompetente Zellen	34
2.4.3. <i>E. coli</i> BL21(DE3)-GOLD	34
2.4.4. <i>E. coli</i> BL21-Codon-Plus <sup>®</sup> (DE3)-RIL	35
2.5. Kulturmedien	35
2.6. Antibiotika	37
<b>3. Methoden</b>	<b>38</b>

<b>3.1. Allgemeiner Teil .....</b>	<b>38</b>
<b>3.2. Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>38</b>
3.2.1. Primersynthese.....	38
3.2.2. Annealing synthetisierter Oligonukleotide .....	38
3.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	39
3.2.4. Reinigung von PCR-Fragmenten .....	39
3.2.5. Einfache Reinigung von Plasmid-DNA.....	40
3.2.6. Mini-Plasmidpräparation mit QIAprepSpin-Säulen.....	41
3.2.7. Midi-Plasmidpräparation mit Qiagen tip-100 Anionentauschersäulen .....	42
3.2.8. Aufkonzentrieren von DNA durch Ethanol oder Isopropanol .....	42
3.2.9. Hydrolytische Spaltung von DNA .....	43
3.2.10. Ligation .....	43
3.2.11. Entsalzung von Ligationsansätzen .....	44
3.2.12. Ortsspezifische Mutagenese .....	44
3.2.13. Agarosegelelektrophorese.....	46
3.2.14. Photometrische DNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung.....	46
3.2.15. DNA-Sequenzanalyse .....	47
3.2.16. Darstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	47
3.2.17. Transformation elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	48
3.2.18. Darstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	48
3.2.19. Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	49
3.2.20. Test- und Blindtransformation kompetenter Zellen .....	50
3.2.21. Stammhaltung und Wachstum .....	50
3.2.22. Herstellung T $\phi$ T-haltiger DNA.....	50
<b>3.3. Proteinchemische Methoden.....</b>	<b>51</b>
3.3.1. Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> .....	51
3.3.2. Präparation von <i>E. coli</i> Rohzelleextrakten .....	52
3.3.3. Hitzedenaturierung .....	52
3.3.4. Affinitätschromatographie.....	53
3.3.5. Entsalzung und Umpufferung.....	54
3.3.6. Ultrafiltration.....	54
3.3.7. Gelfiltration.....	55
3.3.8. Proteinkonzentrationsbestimmung .....	56
3.3.9. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	56
3.3.10. ELISA.....	58
3.3.11. Kapillarelektrophorese.....	59
<b>3.4. Proteinkristallisation und Strukturbestimmung .....</b>	<b>59</b>
3.4.1. <i>hanging drop</i> -Kristallisation .....	60
3.4.2. <i>sitting drop</i> -Kristallisation.....	61

3.4.3.	<i>soaking</i> -Experimente.....	61
3.4.4.	<i>seeding</i> -Experimente .....	62
3.4.5.	Cokristallisation .....	62
3.4.6.	Austesten von Cryo-Bedingungen .....	63
3.4.7.	Datensammlung und Datenreduktion.....	63
3.4.8.	Modellbau und Strukturverfeinerung .....	64
3.4.9.	Suche nach Sequenz- und Strukturhomologen .....	65
3.4.10.	Graphische Darstellungen.....	65
<b>4.</b>	<b>Resultate.....</b>	<b>66</b>
4.1.	<b>Cokristallisation von <i>A. nidulans</i> Photolyase mit Thymindimer enthaltender DNA.....</b>	<b>66</b>
4.1.1.	Proteinvorbereitung und Bindungsansatz .....	67
4.1.2.	Kristallisation .....	67
4.1.3.	Datensammlung und Strukturbestimmung der CPD-DNA/Photolyase Komplexe .....	68
4.1.4.	Kontrolle des CPD-Schadens durch Kapillarelektrophorese .....	71
4.2.	<b>Kristallisation von <i>A. thaliana</i> Cryptochrom 3.....</b>	<b>73</b>
4.2.1.	Datensammlung und Strukturbestimmung von <i>A. thaliana</i> Cryptochrom 3.....	74
4.3.	<b>Cokristallisation von <i>A. thaliana</i> Cryptochrom 3 mit Thymindimer enthaltender ssDNA .....</b>	<b>77</b>
4.3.1.	Proteinvorbereitung und Bindungsansatz .....	78
4.3.2.	Kristallisation .....	78
4.3.3.	Datensammlung und Strukturbestimmung der CPD-DNA/Cryptochrom 3 Komplexe .....	79
4.4.	<b>Natürliche und artifizielle Antennenchromophore in <i>T. thermophilus</i> DNA-Photolyase .....</b>	<b>82</b>
4.4.1.	Generierung der R46E Mutante von <i>T. thermophilus</i> DNA-Photolyase .....	82
4.4.2.	Expression und Aufreinigung nativer DNA Photolyase und R46E Mutante.....	84
4.4.3.	Quantifizierung der Flavin-Chromophore.....	86
4.4.4.	UV/Vis-Spektroskopie .....	87
4.4.5.	Photoaktivierung.....	88
4.4.6.	ELISA Aktivitätsassays zur Photoreaktivierung .....	93
4.4.7.	Kristallisation der <i>T. thermophilus</i> Photolyase mit artifiziellen Flavinanaloge.....	95
4.4.8.	Datensammlung und Strukturbestimmung.....	97
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>100</b>
5.1.	<b>Cokristallstruktur des Photolyase/DNA-Komplexes .....</b>	<b>100</b>
5.1.1.	Gesamtstruktur und DNA-Bindung der DNA-Photolyase.....	100
5.1.2.	Das gespaltene CPD in der katalytischen Bindungstasche .....	105
5.1.3.	Der katalytische Cofaktor und mögliche Elektronentransferwege .....	108
5.1.4.	Die CPD-Spaltungsreaktion .....	110

5.1.5.	Konsequenzen für andere Photolyaseklassen .....	111
<b>5.2.</b>	<b>Reparatur von einzelsträngiger CPD-haltiger DNA in der Antennenregion von <i>Anacystis nidulans</i> DNA-Photolyase .....</b>	<b>112</b>
<b>5.3.</b>	<b>Kristallstruktur von <i>A. thaliana</i> Cryptochrom 3 .....</b>	<b>115</b>
5.3.1.	Gesamtstruktur .....	115
5.3.2.	Intramolekulare Elektronentransferwege in Cryptochrom 3 .....	117
5.3.3.	Die N-terminale Verlängerung .....	118
5.3.4.	Die Antennenchromophor-Bindungsstelle .....	120
5.3.5.	Spektroskopische Charakterisierung von Wildtyp und E149A Mutante .....	123
<b>5.4.</b>	<b><i>A. thaliana</i> Cryptochrom 3 als spezifische Photolyase für einzelsträngige DNA .....</b>	<b>125</b>
5.4.1.	Cokristallstruktur des Cryptochrom 3/DNA-Komplexes.....	126
5.4.2.	Das Thymin-Dimer in der katalytischen Bindungstasche .....	128
5.4.3.	Der katalytische Cofaktor und Elektronentransferwege .....	129
<b>5.5.</b>	<b>Inkorporierung natürlicher und artifizierter Flavinanaloga in die DNA-Photolyase aus <i>T. thermophilus</i> .....</b>	<b>130</b>
5.5.1.	Reparaturaktivitäten der Holo- und Apophotolyase.....	130
5.5.2.	Einbau von 8-HDF in die Antennenchromophorbindungstasche .....	131
5.5.3.	Einbau verschiedener Antennenchromophore .....	134
<b>6.</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>137</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>138</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>152</b>
8.1.	Abkürzungen .....	152
8.2.	Tabellenverzeichnis.....	156
8.3.	Abbildungsverzeichnis .....	157
<b>8.4.</b>	<b>Kristallisationsscreens .....</b>	<b>162</b>
8.4.1.	Hampton Crystal Screen .....	162
8.4.2.	Hampton Crystal Screen Lite.....	164
8.4.3.	Sigma Basic Screen .....	166
8.4.4.	Sigma Extension Screen .....	167
8.4.5.	Sigma Cryo Screen .....	168
8.4.6.	Nextal Classic Suite.....	169
8.4.7.	Nextal Classic Lite Suite .....	171
8.4.8.	Nextal Anions Suite .....	173





## Zusammenfassung

Die Einwirkung von kurzwelliger UV-Strahlung führt in allen Organismen durch die Bildung von Photoaddukten zu schwerwiegenden Schädigungen der die Erbinformationen tragenden DNA. Die überwiegend auftretenden Photoschäden sind hierbei Cyclobutanpyrimidindimere (CPDs), die durch eine photochemisch induzierte Zyklisierungsreaktion von zwei auf einem DNA-Strang benachbarten Pyrimidinen, meist Thyminen, entstehen. Die für die genetische Integrität eines Organismus notwendige Reparatur wird in vielen Lebewesen mit Hilfe von Photolyasen durch die blaublichtinduzierte Spaltung dieser Dimere bewerkstelligt. Demzufolge besteht ein großes Interesse an der Aufklärung des Reparaturmechanismus, der diesen Enzymen zugrunde liegt. Bis zum Beginn dieser Arbeit lagen drei Proteinkristallstrukturen von Photolyasen vor, die ohne Substrat kristallisiert wurden.

Diese Arbeit präsentiert die bei einer Auflösung von 1.8 Å gelöste Cokristallstruktur von *A. nidulans* Photolyase in einem Komplex mit Duplex-DNA, die einen synthetisch hergestellten CPD-Schaden enthält. Der unter dem Einfluss der verwendeten Synchrotronstrahlung bei 100 K in zwei Thymine gespaltene CPD-Schaden ist vollständig aus der Duplex-DNA heraus- und in das aktive Zentrum der Photolyase hineingedreht. Die Struktur imitiert ein strukturelles Intermediat während der DNA-Reparatur, in dem das Zurückdrehen der Thymine in die Duplex-DNA noch nicht stattgefunden hat. Sowohl die seit langem bestehende und durch Modellrechnungen, biochemische Daten sowie NMR-Spektroskopie gestützte Hypothese des *dinucleotid-flipping*-Mechanismus, als auch das Knicken der DNA um 50 ° bei DNA-Bindung, konnten mit Hilfe dieser Struktur bestätigt werden. Gleichmaßen konnten die exakte Geometrie des katalytischen Flavincofaktors und der genaue Bindungsmodus des CPD-Schadens mit der Photolyase aufgeklärt werden. Die beobachteten Wechselwirkungen des Substrats mit der Proteinumgebung definieren die Sequenzabfolge 5'-NpT◊TpNpNp-3' als allgemeines Erkennungsmotiv für Photolyasen. Aus strukturellen Überlegungen heraus ergeben sich für den Elektronentransport vom FAD auf den CPD-Schaden sowohl ein direkter Weg über die C8-Methylgruppe des FAD als auch ein indirekter Weg, der über die Beteiligung des Adeninrestes verläuft. Die im Verlauf dieser Arbeit erhaltenen strukturellen Erkenntnisse liefern wertvolle Informationen über das detaillierte Verständnis des wichtigsten direkten DNA-Reparaturprozesses.

Cryptochrome sind strukturell eng mit den Photolyasen verwandt und bilden mit ihnen eine Superfamilie. Sie gehören zu den wichtigsten Blaublichtrezeptoren und steuern bspw. die

circadiane Rhythmik in vielen Lebewesen. Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Struktur und der Charakterisierung von Cryptochrom 3 (Cry3) aus *A. thaliana*. Das Enzym gehört zur Klasse der sogenannten DASH-Cryptochrome, deren Funktion bisher weitgehend ungeklärt ist.

Durch die Aufklärung der Kristallstruktur von *A. thaliana* Cry3 bei einer Auflösung von 1.9 Å konnte MTHF als Antennenchromophor identifiziert werden. Die Cokristallstruktur von *A. thaliana* Cry3 mit einem Pentanukleotid, das einen CPD-Schaden enthält, konnte ebenfalls erfolgreich röntgenkristallographisch bei einer Auflösung von 2.0 Å gelöst werden. Analog zu der für *A. nidulans* Photolyase erhaltenen Cokristallstruktur, ist der DNA-Schaden ebenfalls im reparierten Zustand vor dem Zurückdrehen der beiden Thyminе aus der Bindungstasche gebunden. Des Weiteren entspricht der beobachtete Bindungsmodus von DNA an *A. thaliana* Cry3 nahezu dem für die Photolyase festgestellten. Für die Elektronentransportwege ist daher zu vermuten, dass sie weitgehend übereinstimmen.

Zur Erweiterung ihres aktiven Spektrums besitzen Photolyasen als Antennenchromophore 8-HDF, MTHF oder FAD. Die im dritten Teil dieser Arbeit durchgeführten ELISA-Aktivitätsassays an FMN-haltiger *T. thermophilus* Photolyase zeigen im Vergleich mit der cofaktorfreen R46E-Mutante bei 450 nm eine achtfach höhere Reparaturaktivität und bestätigen damit die Bedeutung des alternativen Antennenchromophors FMN. Durch Rekonstitution der *T. thermophilus* Photolyase mit natürlich vorkommendem FMN und 8-HDF sowie dem artifiziellen 8-Iodo-8-demethylriboflavin (8-IRF) und anschliessender kristallographischen Bestimmung der Bindungsmodi konnten die Vielseitigkeit der Antennenbindungstasche klar beweisen. Der Einbau unterschiedlicher Antennenchromophore mit verschiedenen spektralen Eigenschaften ermöglicht so künftig ein „Wellenlängentuning“ und die Erweiterung des aktiven Spektrums für die DNA-Reparatur von Photolyasen.



## Summary

The influence of short wave ultraviolet radiation can cause severe DNA damages by forming photoadducts. The major UV-induced photolesions are cyclobutane-pyrimidine dimers (CPDs) which are formed in a photochemically induced cyclization reaction of two adjacently located pyrimidine bases, mainly thymine. To ensure the genetic integrity many organisms contain DNA photolyases. These enzymes are capable of repairing DNA lesions by blue light induced cleavage of the dimer. The full details of the repair mechanism are not yet clear. Only three protein structures of photolyases without any detail on substrate binding were available. One of the aims of this study was to elucidate the binding and repair mechanism of photolyases by cocrystallization of a photolyase and CPD-comprising DNA.

This study presents the 1.8 Å cocrystal structure of *A. nidulans* photolyase bound to duplex DNA comprising a synthetic CPD lesion. The structure reveals the CPD lesion completely turned out of the double helix and flipped into the active site. Interestingly, the thymine dimer was found to be split into two thymines by synchrotron radiation at 100 K. The structure mimics a structural intermediate during DNA repair in which back-flipping of the thymines into duplex DNA has not yet taken place. Both, the dinucleotide flipping mechanism which has been a long-standing hypothesis, supported by many computer model calculations, biochemical data and NMR spectroscopy, and the DNA bending of 50 ° upon DNA binding could be confirmed with this cocrystal structure. Likewise, the exact geometry of the catalytic flavin cofactor and the precise binding mode between the CPD lesion and the photolyase could be elucidated. Observed interactions between DNA and the photolyase define a 5'-NpT $\diamond$ TpNpNp-3' signature as a common signature motif of DNA binding by photolyases. Structural considerations give rise to either a direct tunneling electron transport pathway from the C8 methyl group of the FAD cofactor to the CPD lesion or an indirect pathway involving the adenine moiety. The structural insights gained from this work provide valuable information on the detailed understanding of the most important direct DNA repair process.

Cryptochromes are closely related to photolyases and are part of the same superfamily. As a member of the blue light photoreceptor family they are known to regulate the circadian rhythm in numerous organisms. The second part of this thesis deals with the structure determination and characterization of *A. thaliana* cryptochrome 3 (cry3) which belongs to the class of the so called DASH-cryptochromes. Up to know, the physiological function of this class of cryptochromes is mostly unknown.

The crystal structure of *A. thaliana* cry3 was solved at a resolution of 1.9 Å, revealing MTHF as an antenna cofactor. Furthermore, the cocrystal structure of *A. thaliana* cry3 bound to a pentanucleotide comprising a CPD lesion could be obtained and successfully characterized by X-ray crystallography at a resolution of 2.0 Å. This structure reveals the DNA lesion bound in its repaired state before back flipping of the two thymines out of the active site, in analogy to the cocrystal structure with the *A. nidulans* photolyase described above. Additionally, the observed binding mode of DNA to *A. thaliana* cry3 mainly corresponds to that monitored in photolyases leading to the assumption that the electron transfer pathways should be mostly identical.

Photolyases contain either 8-HDF, MTHF or FAD as an antenna cofactor to broaden their activity spectrum. The ELISA activity assays on *T. thermophilus* photolyase carried out in the third part of this thesis show an eightfold higher repair activity at 450 nm for the FMN-containing photolyase compared to the activity of the cofactor-free R46E mutant of the enzyme. Thus, the importance of FMN as an alternative antenna chromophore could be confirmed. Reconstitutions of the native photolyase with the naturally occurring cofactors FMN and 8-HDF as well as the artificial 8-iodo-8-demethyl-riboflavin (8-IRF) and subsequent crystallographic analysis of the binding modes clearly showed the promiscuity of the antenna pigment binding site. With the insertion of various synthesized antenna chromophores possessing different spectral properties it should now be possible to broaden the activity spectrum for photolyase DNA repair.

## 1. Einleitung

### 1.1. Schädigung der DNA durch UV-Strahlung

Sonnenlicht ist essentiell für die meisten Lebensformen auf der Erde. Die Erbinformationen in prokaryontischen und eukaryontischen Zellen sind durch doppelhelikale DNA-Stränge codiert, auf denen die vier Nucleotide Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin in vielfältigen Kombinationen an ein Desoxyribosephosphatrückgrat gebunden sind [Watson, 1953]. Dabei gehen Adenin und Thymin sowie Guanin und Cytosin jeweils Watson-Crick-Basenpaarungen unter Ausbildung von zwei bzw. drei Wasserstoffbrücken ein.

Unterschiedlichste endo- und exogene Faktoren können zu Mutationen in der für das Überleben der Zelle unabdingbaren einwandfreien Abfolge der Basensequenz führen. Als exogene Faktoren können im Besonderen chemische Agentien, UV-Strahlung, ionisierende Strahlung und verschiedene oxidative Schädigungen für Veränderungen an der DNA und den daraus resultierenden, veränderten Genprodukten verantwortlich gemacht werden [Lewine, 1991]. Ein erster Nachweis für Mutationen in lebenden Organismen, die beispielsweise durch ionisierende Strahlung ausgelöst werden, wurde bereits 1927 von Muller erbracht [Muller, 1927].

Im Weiteren wird näher auf den Einfluss von UV-Strahlung auf das Genom eingegangen, da die daraus resultierenden CPD-Schäden den Gegenstand des in dieser Arbeit untersuchten Reparaturmechanismus darstellen. Entscheidend für die dreiteilige Gliederung des gesamten UV-Spektrums ist die Energie des UV-Lichts. Der langwellige UV-A-Bereich umfasst Strahlung von  $\lambda_{\text{UV-A}} = 320\text{-}400\text{ nm}$ , in den UV-B-Bereich fallen Wellenlängen von  $\lambda_{\text{UV-B}} = 290\text{-}320\text{ nm}$ . Als hochenergetische UV-C-Strahlung wird der Bereich von  $\lambda_{\text{UV-C}} = 100\text{-}290\text{ nm}$  bezeichnet.

In hohem Maße anfällig gegenüber energiereicher Strahlung sind die aromatischen Basen der DNA aufgrund ihres Hauptabsorptionsmaximums bei  $\lambda_{\text{max}} = 260\text{ nm}$ . Schäden können direkt durch Absorption von UV-B oder indirekt durch oxidativen Stress ausgelöst werden. Auftretende Schädigungen finden hierbei größtenteils durch photochemisch induzierte Zyklisierungsreaktionen statt.

Oxidativer Stress, der durch UV-A und UV-B-Strahlung ausgelöst wird, fördert die Bildung von 8-Hydroxy-2'-desoxyguanosin (8-oxoG). In der Folge bewirkt 8-oxoG oft eine Transversion von G:C zu T:A während der Replikation [Finkel, 2000].

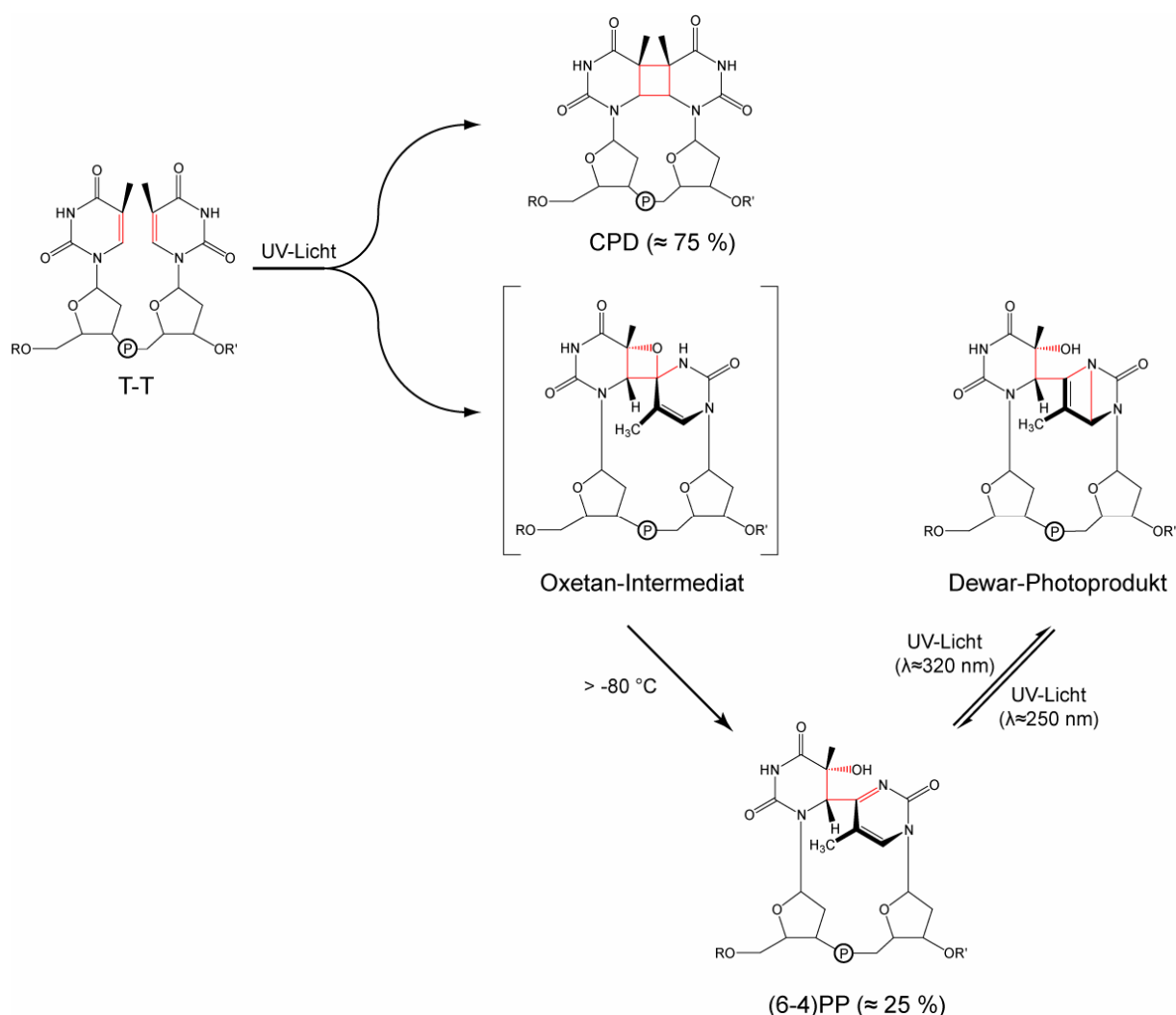
Zu hohe Dosen von UV-Strahlung bewirken beispielsweise Photoalterung und Immunsuppression [Taylor, 1990; Gilchrest, 1989]. Die Bildung von genotoxischen Produkten wird in DNA insbesondere durch UV-B-Strahlung verursacht, weshalb diese einen wesentlichen Teil zur Photokarcinogenese beiträgt.

Vererbare Fehlfunktionen in den einzelnen DNA-Reparatursystemen können beim Menschen schwere Krankheiten hervorrufen, wenn sie zum Versagen einzelner Reparaturmechanismen führen. Die autosomal rezessiv vererbte Krankheit *Xeroderma pigmentosum* (XP) bedingt bei den betroffenen Personen neben einer extremen Überempfindlichkeit gegenüber Sonnenlicht ein ca. 10.000-fach erhöhtes Risiko für viele Hautkrebsarten, die durch Sonneneinstrahlung hervorgerufen werden. Ebenso erleiden ihre übersensiblen Zellen deutlich schneller den Zelltod durch UV-Strahlung als solche von nicht-XP-Patienten. Ein Gendefekt in der Kaskade der Nukleotidexcisionsreparatur (NER) hat hier zur Folge, dass entstandene CPD-Schäden nicht repariert werden können [Bernerd, 2001; Kraemer, 1997; Taylor, 1995; Eller, 1994; Kraemer, 1994]. Ebenso besteht eine deutlich erhöhte Prädisposition für vererbaren nichtpolypenbildenden Darmkrebs (HNPCC) und andere Krebsarten. Weitere Krankheiten wie Trichothiodystrophie und das Cockayne-Syndrom haben ebenfalls ihre genetische Ursache in Defekten des NER-Systems [Bohr, 2007; Friedberg, 2007; Kraemer, 2007; Trushina, 2007].

### 1.2. Cyclobutanpyrimidindimere und (6-4)Photoprodukte

Die durch UV-Schädigung von DNA entstehenden Hauptprodukte sind Cyclobutanpyrimidindimere (CPD) mit einem Anteil von 80-90 % [Ravanat, 2001]. Die Energie ultravioletter Strahlung löst eine photochemisch induzierte  $[2\pi+2\pi]$ -Cycloaddition zwischen zwei auf einem DNA-Strang benachbarten Pyrimidinen aus, bei der die beiden Basen über Bindungen zwischen den C5- und C6-Atomen kovalent miteinander verknüpft werden (Abbildung 1.1). Von den vier möglichen Basenkombinationen wird in der Natur fast ausschließlich das Thymin-Thymin-Dimer beobachtet [Setlow, 1966]. Die anderen in Frage kommenden Varianten T $\diamond$ C, C $\diamond$ T und C $\diamond$ C treten mit einer deutlich geringeren Wahrscheinlichkeit auf. Die Ursache hierfür liegt in der niedrigeren Triplett-Energie für Thymin verglichen mit Cytosin, weshalb Thymin entlang der DNA-Doppelhelix eine Energiesenke darstellt und dessen Dimerisierung bevorzugt wird [Lamola, 1973]. Der Bildungsmechanismus für Pyrimidin-Pyrimidin-Dimere entspricht einer

[ $2\pi+2\pi$ ]-Cycloaddition der angeregten Singulettzustände zweier Pyrimidine. In doppelsträngiger DNA konnte von den vier möglichen Stereoisomeren (*cis,syn*, *cis,anti*, *trans,syn* und *trans,anti*) bisher ausschließlich das *cis,syn*-Dimer nachgewiesen werden [Heelis, 1993]. Die alleinige Entstehung dieses Isomers ist durch die B-Typ-Konformation der DNA-Doppelhelix begründet, in der zwei benachbarte Basen nicht direkt übereinander, sondern etwas verschoben zueinander angeordnet sind. Die dreidimensionale Struktur dieses T-T-Dimers in einem freien DNA-Doppelstrang konnte 1998 durch NMR-Untersuchungen in Lösung bestimmt werden (pdb-code: 1TTD) [McAteer, 1998].



**Abbildung 1.1:** Bildung der beiden primären UV-Schäden, dem *cis, syn*-Cyclobutanpyrimidindimer (CPD) und dem (6-4)Photoprodukt ((6-4)PP), aus zwei benachbarten Pyrimidinen.

Biologisch bedeutsam sind ferner (6-4)Photoproducte ((6-4)PP), da sie mit 10-20 % aller UV-induzierten DNA-Schäden den zweiten Rang hinter den oben beschriebenen CPDs einnehmen. Ausgangspunkt der (6-4)PP-Bildung sind die angeregten Triplettzustände von zwei Thyminen, die in einem Singulett-Triplett *intersystem crossing* zunächst eine Paterno-Büchi-Reaktion zur Oxetangenerierung durchlaufen. Im ersten Schritt der Gesamtreaktion wird dieses zwischen der C5/C6-Doppelbindung des einen und der Carbonylgruppe des anderen Thymins ausgebildet. Dieses intermediäre Oxetan reagiert daraufhin direkt zum stabileren (6-4)PP bzw. dessen Dewarisoimer weiter (Abbildung 1.1) Durch Rotation des 3'-Thymins kann es eine Wasserstoffbrücke zu einem benachbarten Guanin ausbilden und somit eine Transition von Thymin zu Cytosin induzieren [Lee, 1999].

Die direkte Spaltung der C5-C5- und C6-C6-sigma-Bindungen bei CPD-Schäden führt zur vollständigen Wiederherstellung der beiden Thymine. Hingegen resultieren als Produkt der Spaltung der C5-OH und C6-C4-Bindungen des (6-4)PP zwei geschädigte Basen, deren Entfernung durch das Excisionssystem sehr effektiv ist [Svoboda, 1993; Sancar, 1983].

Die beiden sterisch anspruchsvollen Schäden führen zur Blockierung der DNA-Replikation bzw. -Transkription. Die Prozessierung der DNA-Polymerase wird an der schadhaften Position zunächst blockiert und überspringt diese dann vollständig, ohne die beiden korrespondierenden Basen zu replizieren. Durch diese Basendeletion wird der Leserahmen um +2 Stellen verschoben und es kommt zu einer *frameshift*-Mutation. Ausnahmen hierzu bilden die an der Replikation geschädigter DNA beteiligte humane DNA-Polymerase Pol  $\eta$  [Ling, 2003; Johnson, 2000; Masutani, 2000] sowie die mit ihr verwandten Enzyme *E. coli* Pol IV [Wagner, 1999], Pol V [Reuven, 1999; Tang, 1999] und *Saccharomyces cerevisiae* Pol  $\eta$  [Johnson, 1999]. Ein vorhandener CPD-Schaden wird übergangen und die DNA dessen ungeachtet effizient und korrekt repliziert. Kommt es mit einer Fehlerrate von  $\approx 10^{-2}$ - $10^{-3}$  dennoch zum Einbau eines falschen Nukleotids in den neu synthetisierten DNA-Strang, ist humane Pol  $\eta$  nicht in der Lage die Kette weiter zu verlängern und die Replikation bricht an dieser Stelle ab [Johnson, 2000].

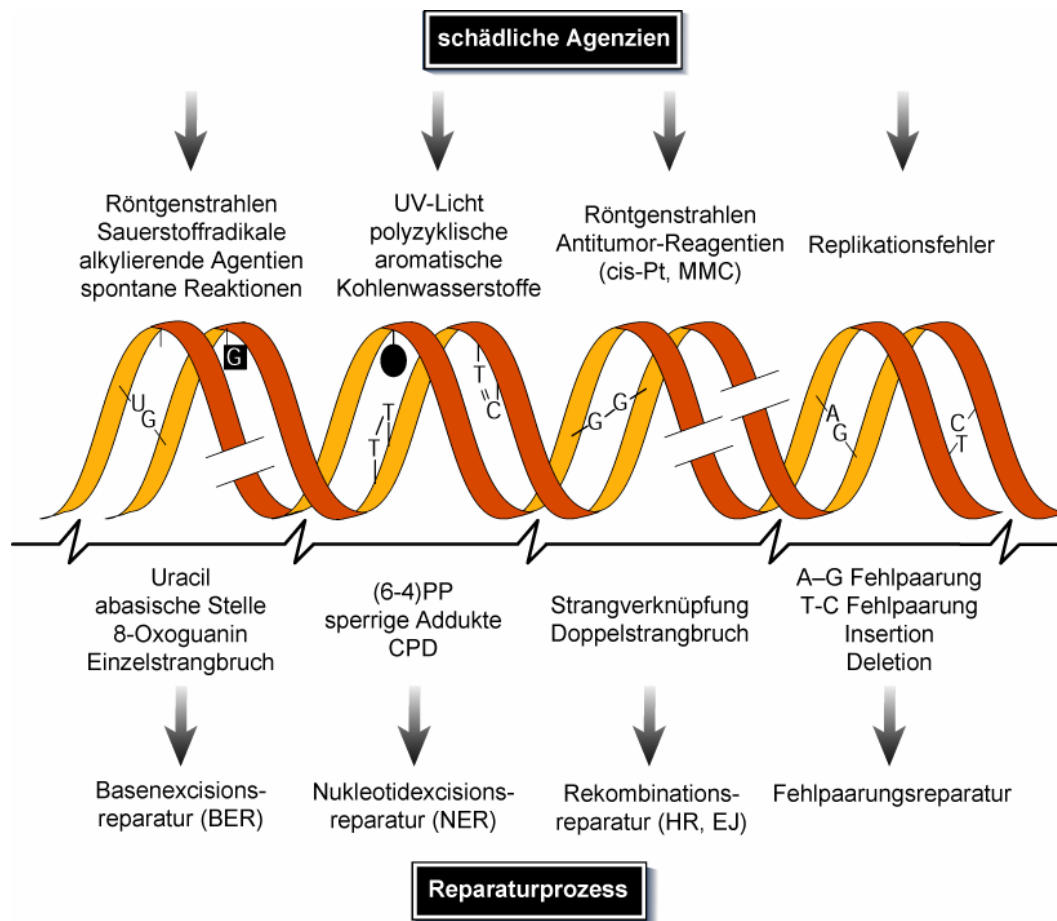
Beide Schadenstypen bewirken in vielzelligen Organismen, bezogen auf die Induktion von Apoptose und den Zellzyklusarrest, unterschiedliche biologische Effekte [Lo, 2005]. Die nach UV-Bestrahlung zum überwiegenden Teil auftretenden CPD-Schäden induzieren in der betroffenen Zelle deutlich häufiger einen Zellzyklusarrest und ermöglichen ihr so eine effektivere Reparatur dieses Schadens bei gleichzeitigem Überleben der Zelle. (6-4)PP hingegen veranlassen die geschädigte Zelle vermehrt zur Einleitung der Apoptose, um das

karzinogene Potential zu verringern. Sowohl CPD-Schäden als auch (6-4)PP besitzen in *E. coli* eine vergleichbare Mutagenizität [Tanaka, 2001]. Untersuchungen an Säugetierzellen aus Mäusen, die sowohl Gene für eine CPD-Photolyase als auch für eine (6-4)Photolyase besaßen, zeigten jedoch, dass CPD-Schäden für etwa 80 % der durch UV-B-Strahlung verursachten Mutationen dieser Zellen verantwortlich sind, während (6-4)PP nur eine untergeordnete Rolle spielen [You, 2001].

### **1.3. DNA-Reparatursysteme**

In einer menschlichen Zelle ereignen sich pro Tag etwa  $10^4$  bis  $10^6$  DNA-Schädigungen [Schaerer, 2003]. Sie können durch Punktmutationen, Translokationen, Deletionen, Duplikationen oder Dimerisierungen zu falscher Replikation während Mitose und Meiose führen und die DNA-Sequenz verändern. Normale Zellfunktionen und -regulationen werden häufig weitreichend gestört oder kommen vollständig zum Erliegen, wenn das aus der Translation hervorgehende Protein seine Funktionsfähigkeit verloren hat. Ein überaus wichtiger Aspekt bei der Betrachtung von DNA-Schädigungen ist die Beschleunigung der Tumorprogression. Im Laufe der Evolution entwickelten sich viele Kontrollenzyme, die bei Erkennung von DNA-Schäden verschiedene zelluläre Antworten auslösen. Sie reichen vom Zyklusarrest der Zelle bis zur Apoptose, wenn der DNA-Schaden nicht repariert werden kann. Betrachtet man die Gesamtheit aller möglichen DNA-Schädigungen, gehören Basenschädigungen und Einzelstrangbrüche mit gemeinsam etwa 90 % zu den am häufigsten auftretenden Läsionen. Doppelstrangbrüche treten hingegen mit 0.5 % im Vergleich dazu relativ selten auf.

Um möglichst alle DNA-Schäden effektiv reparieren zu können, kommen in den meisten höheren Organismen mehrere auf unterschiedliche Läsionen spezialisierte Reparatursysteme zum Einsatz (Abbildung 1.2). Im Unterschied zu vielen einzelligen Lebewesen, Pflanzen und verschiedenen Tierarten besitzen Säugetiere, von Beuteltieren abgesehen, keine Photolyasen, um CPD-Schäden direkt zu reparieren. Der folgende Abschnitt gibt einen kurzen Überblick über die wichtigsten Vertreter der Reparatursysteme in höher entwickelten Organismen.



**Abbildung 1.2:** DNA Schäden und Reparaturmechanismen. Typische Auslöser für DNA-Schädigungen (oben), Beispiele für durch diese ausgelöste DNA-Schäden (Mitte) und hauptverantwortlicher Reparaturmechanismus für die Beseitigung der Schäden (unten). Abbildung nach [Hoeijmakers, 2001].

## 1.3.1. Nucleotidexcisionsreparatur (NER)

Spezielle Reparatur-Endonukleasen erkennen vor allem helixverzerrende DNA-Schädigungen und entfernen diese durch Hydrolyse von zwei Phosphodiesterbindungen eines etwa 30 Basen umfassenden Oligonukleotids, das den Schaden enthält. Nachdem eine DNA-Polymerase den fehlenden DNA-Abschnitt ersetzt hat, wird der Reparaturprozess mit der Ligation der freien Enden durch eine DNA-Ligase abgeschlossen.

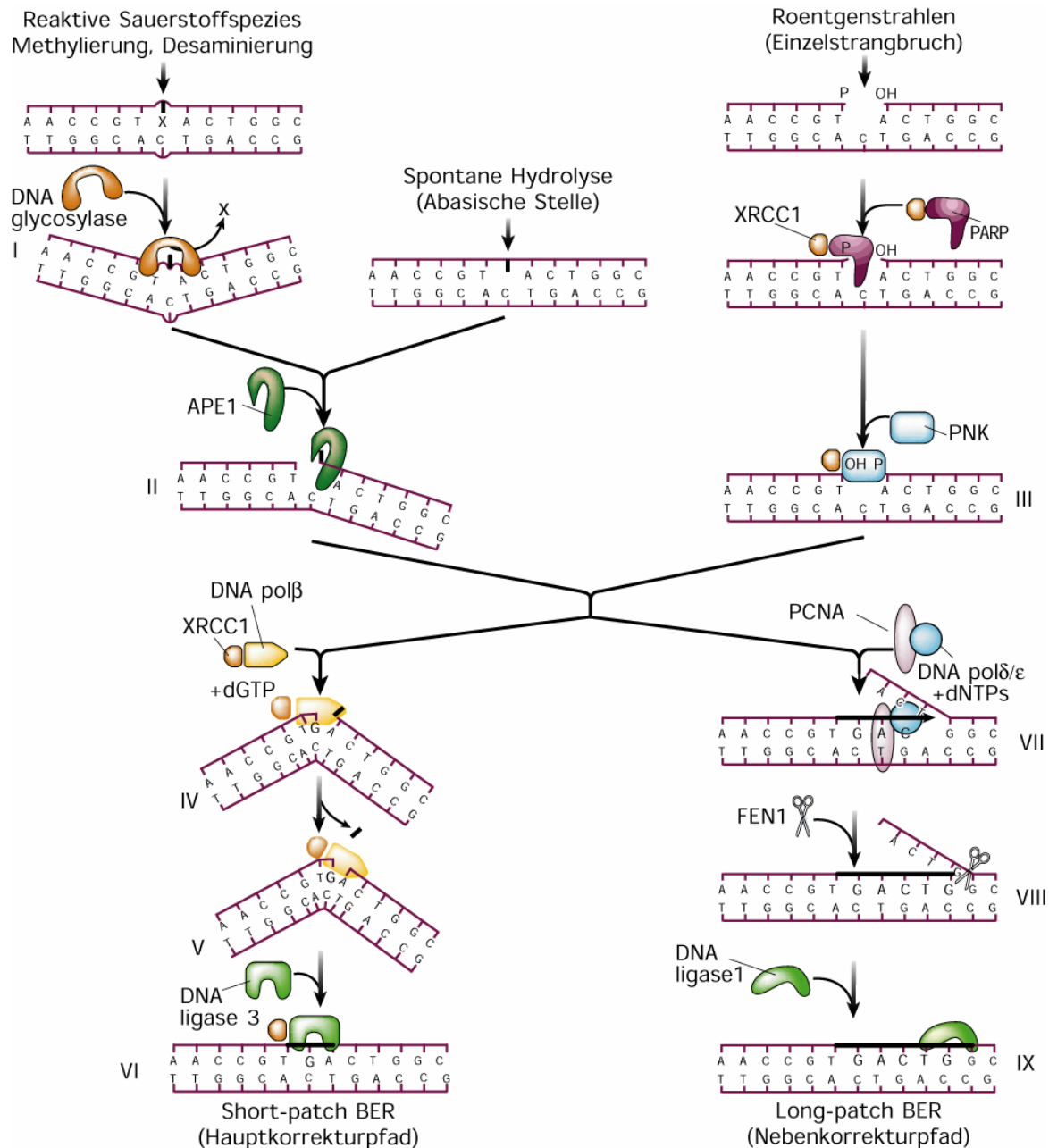
Sowohl Thymindimere als auch der (6-4)-Photoschaden werden auf diese Weise repariert. Mutationen in den Exonukleasen der Enzymfamilie XPA-XPG führen beim Menschen zu der Krankheit *Xeroderma pigmentosum* [Kraemer, 2007].



### 1.3.2. Basenexcisionsreparatur (BER)

Die von diesem System reparierten DNA-Schäden haben ihre Ursachen beispielsweise im Verlust der Methylierung, der Desaminierung von Cystein oder der thermischen Depurinisierung. Auch Einzelstrangbrüche, die etwa durch die Einwirkung von Röntgenstrahlen entstehen können, und durch spontane Hydrolyse auftretende abasische Stellen werden in die Basenexcisionsreparatur (BER) eingeschleust (Abbildung 1.3). Bei der BER dient der Komplementärstrang als Vorlage für die Reparatur des geschädigten DNA-Strangs. Zunächst wird die fehlerhafte Base aus dem betreffenden DNA-Strang durch Hydrolyse der N-glycosidischen Bindung zwischen Base und Desoxyribose mittels einer schadensspezifischen Glykosylase entfernt. Eine AP-Endonuklease (A-Purin-A-Pyrimidin-Endonuklease, APE1) katalysiert im Anschluss das Ausschneiden der Desoxyribose an der entstandenen abasischen Stelle. Die Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) wird durch Einzelstrangbrüche in der DNA aktiviert und bindet an diese. Die erst vor wenigen Jahren entdeckte Polynukleotidkinase (PNK) spielt möglicherweise eine Schlüsselrolle beim Schutz der freien Enden und deren Vorbereitung für die sich anschließende Reparatur, wenn die Auslösung des Reparaturmechanismus durch einen Einzelstrangbruch erfolgt [Whitehouse, 2001].

Im kurzen Reparaturweg, der bei Säugetieren dominiert, wird durch die DNA-Polymerase  $\text{pol}\beta$  ein fehlendes Nukleotid ergänzt und mittels ihrer vorhandenen Lyaseaktivität der basenfreie Zuckerrest am 5'-Ende herausgeschnitten. Den Abschluss der Reparatur bildet die Knüpfung der letzten Phosphodiesterbindung durch den XRCC1–DNA-Ligase 3-Komplex. Die über den langen Reparaturweg verlaufende BER benötigt in einem ersten Schritt die DNA-Polymerasen  $\text{pol}\beta$ ,  $\text{pol}\delta/\epsilon$  sowie PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) für die DNA-Verlängerung von zwei bis zehn Nukleotiden am 3'-Ende. Endonuklease FEN1 schneidet schließlich die überzähligen Nukleotide heraus und DNA-Ligase 1 verbindet die beiden noch offenen Enden.



**Abbildung 1.3:** Mechanismus der Basenexcisionsreparatur (BER). Abbildung nach [Hoeijmakers, 2001].

## 1.3.3. Fehlpaarungsreparatur (MMR)

Kurze Deletionen oder Insertionen werden in höheren Organismen durch Fehlpaarungsreparatur (*mismatch repair*) behoben [Iyer, 2006]. Die Fehler in der DNA-Sequenz werden von verschiedenen Enzymen erkannt. Eine Strangdiskriminierung und Entscheidung für die zu verwendende Endonuklease wird von weiteren Enzymen

durchgeführt, so dass ausschließlich der neue, falsch synthetisierte und noch nicht methylierte Strang repariert wird. Die entstandene und bis zu eintausend Basenpaare große Lücke wird mit den zu ergänzenden Nukleotiden, die von DNA-Polymerase III synthetisiert werden, aufgefüllt. Eine DNA-Ligase verknüpft abschließend die freien Enden.

Mithilfe dieses Systems erkannten Schädigungen entstehen hauptsächlich durch zufällige Mutationen und fehlerhaft gepaarte Basen, die während der Replikation nicht korrekt eingebaut wurden.

#### **1.3.4. Homologe Rekombination (HR) und *End Joining* (EJ)**

Doppelstrangbrüche (DSB) der DNA entstehen hauptsächlich nach Schädigung der Erbsubstanz durch ionisierende Strahlung, freie Radikale oder chemische Agenzien. Sofern ein DSB während der Replikation eines Einzelstrangbruchs (SSB) entstanden und daher eine zweite identische DNA-Kopie verfügbar ist, erfolgt die Reparatur vorzugsweise über homologe Rekombination (HR). In allen anderen Fällen kommt das fehlerbehaftete *end joining* (EJ) zum Einsatz, das zum Verlust oder zusätzlichen Einbau einiger Nukleotide führen kann.

Mechanistisch sorgt bei der HR zunächst ein Enzymkomplex für die Fähigkeit, einen Einzelstrang mit der identischen Sequenz eines zweiten DNA-Doppelstrangs auszutauschen. Im Anschluss an die erfolgreiche Suche nach homologer DNA und der Ausbildung von Holliday-Verzweigungen dient die intakte Kopie als Templat für die Reparatur der Bruchstelle. Ist die DNA-Synthese abgeschlossen, werden die Holliday-Verzweigungen durch Resolvasen aufgelöst. Ohne Templat kommt das EJ aus, da mithilfe eines Enzymkomplexes und der Proteinkinase DNA-PK<sub>CS</sub>, die an beide Seiten des Schadens binden, sowie XRCC4-DNA-Ligase 4 ausschliesslich die beiden Enden des DSB verknüpft werden.

#### **1.3.5. Photoreaktivierung**

Die Photoreaktivierung wird auch als direkte DNA-Reparatur bezeichnet. Nach einem lichtabhängigen Reparaturmechanismus werden bestimmte DNA-Schäden durch die Einwirkung eines einzelnen Enzyms aus der Klasse der DNA-Photolyasen repariert. Im folgenden Kapitel werden die Einzelheiten dieser besonderen Art der DNA-Reparatur

detailliert beschrieben, da der Forschungsschwerpunkt dieser Arbeit in der eingehenden Untersuchung und dem genauen Verständnis dieses einzigartigen DNA-Reparaturmechanismus liegt.

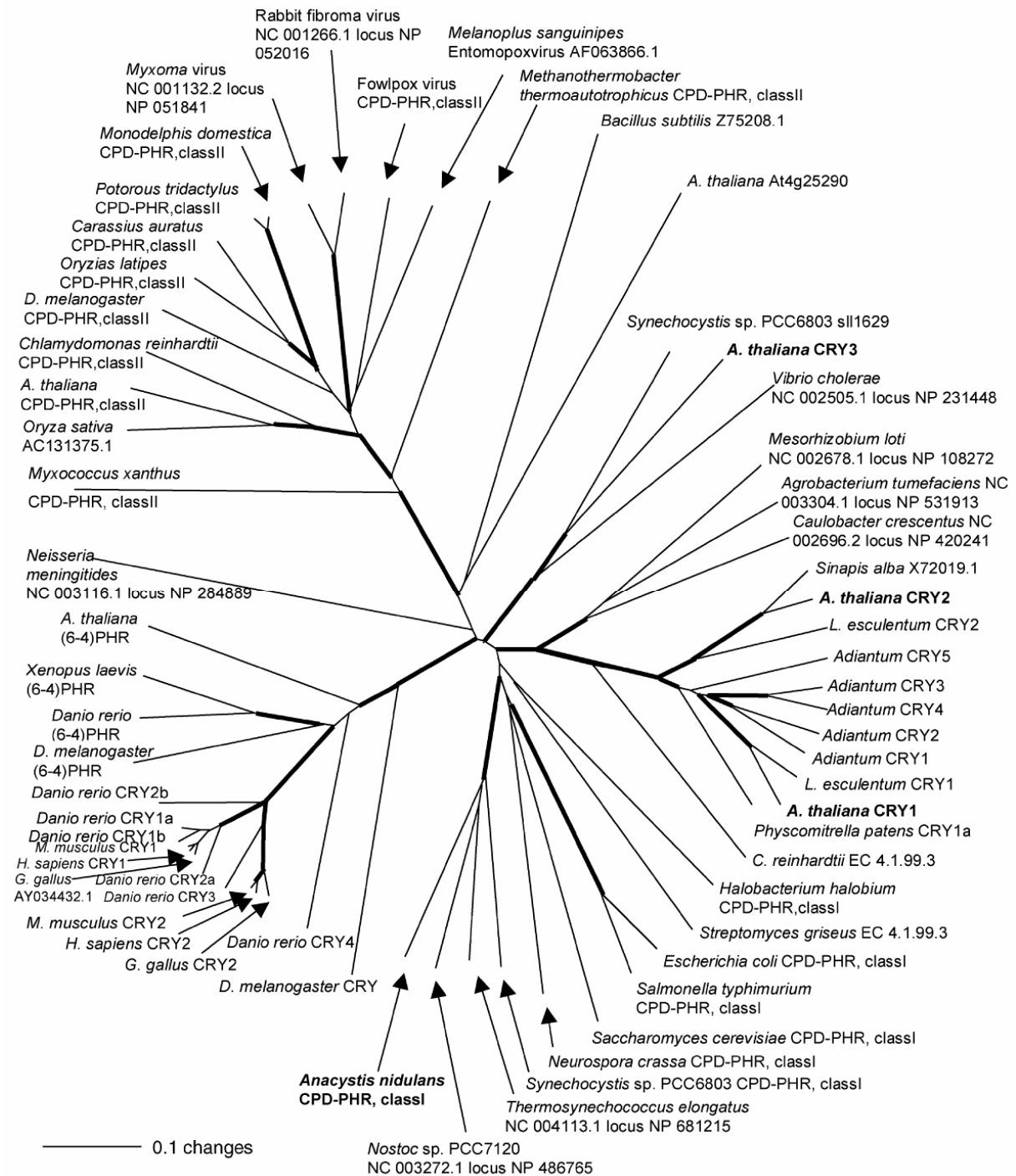
### 1.4. DNA-Photolyasen

#### 1.4.1. Überblick

In der Frühgeschichte der Erde vor 2.5 bis 3.8 Milliarden Jahren führte das Fehlen einer vor UV-Strahlung schützenden Ozonschicht zu einer im Vergleich zu heute deutlich höheren Einstrahlung ungefilterter UV-C-Strahlung auf die Erdoberfläche und die oberen Schichten der Ozeane. Die damals um etwa drei Größenordnungen höhere Strahlungsbelastung limitierte sowohl das Überleben als auch die Wachstumsrate von Organismen in den dieser Strahlung ausgesetzten Bereichen [Cockell, 2001]. Daher ist wenig verwunderlich, dass sich Photolyasen in allen drei Reichen des Lebens entwickelten (Abbildung 1.4).

Die erste Beschreibung einer als Photoreaktivierung bezeichneten enzymatischen Reparatur von lichtinduzierten Cyclobutanpyrimidindimeren (CPDs) geht auf das Jahr 1949 zurück [Kelner, 1949]. Die zunächst mit UV-Licht geschädigten *Streptomyces griseus* Zellen zeigten unter sichtbarem Licht eine stark ansteigende Regenerationsrate dieser DNA-Schäden. Das für diese Reparatur verantwortliche Protein wurde zunächst als photoreaktivierendes Enzym bezeichnet und nach der Entdeckung, dass es sich um ein Flavoprotein handelt, in DNA-Photolyase (EC 4.1.99.3) umbenannt. Als Substrate für dieses außergewöhnliche, lichtgetriebene Enzym wurden bereits 1962 von Wulff und Rupert Thymin-Thymin-Dimere identifiziert [Wulff, 1962]. In den letzten Jahren sind zahlreiche Übersichtsartikel zu diesem Themenkomplex veröffentlicht worden, die sich mit den vielen Facetten der Photolyasen beschäftigen [Essen, 2006b; Essen, 2006c; Sancar, 2006; Weber, 2005; Sancar, 2003; Carell, 2001].

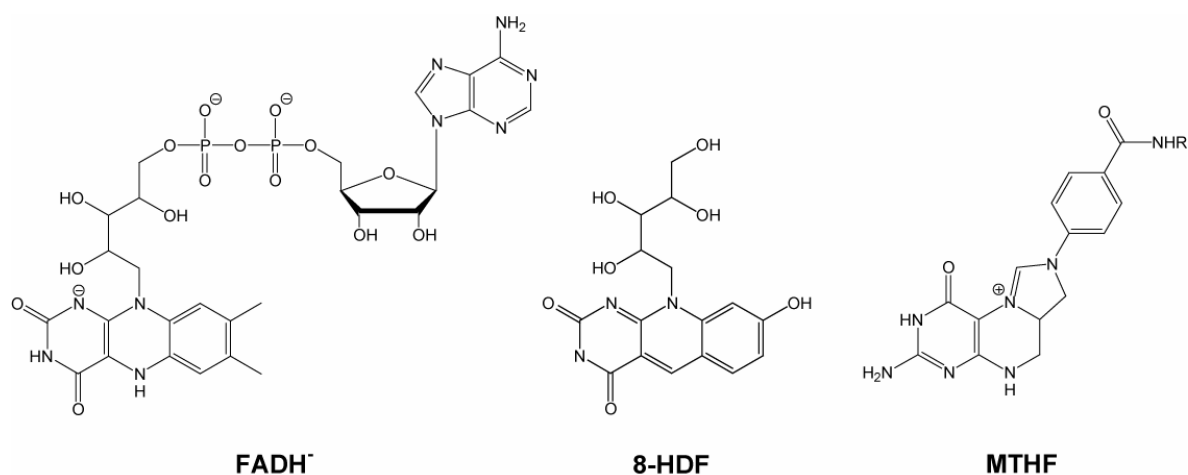
Die beiden durch Einwirkung von UV-Licht überwiegend auftretenden Schädigungen der DNA sind *cis-syn*-Cyclobutanpyrimidindimere und Pyrimidin-Pyrimidon (6-4)Photoprodukte (6-4 PP). Durch diese sperrigen Photoaddukte kommt es häufig zu einer Blockierung der Replikations- und Transkriptionsphase, was sie hauptverantwortlich für den in der Folge dieser cytotoxischen Effekte entstehenden Hautkrebs macht [Lima-Bessa, 2005].



**Abbildung 1.4:** Phylogenetischer Stammbaum für Sequenzen aus der Photolyase/Cryptochrom Familie. Die *Anacystis nidulans* Photolyase sowie die *Arabidopsis thaliana* Cryptochrome Cry1, Cry2 und Cry3 sind hervorgehoben. Übernommen aus [Kleine, 2003].

Photolyasen verwenden Licht der Wellenlängen von 320 bis 500 nm als Energiequelle, um DNA-Schäden zu reparieren. Aufgrund ihrer Fähigkeit, einen von zwei verschiedenen

DNA-Schäden zu reparieren, findet eine Klassifizierung der DNA-Photolyasen nach ihrem Substrat in CPD-Photolyasen und (6-4)-Photolyasen statt [Sancar, 1994]. Obwohl beide Photolyase-Typen nur in der Lage sind, einen der beiden Schadenstypen zu regenerieren [Todo, 1993; Brash, 1985], gehören sie aufgrund von Sequenzähnlichkeiten der gleichen Proteinfamilie an und teilen miteinander die ihnen zugrunde liegenden Reparaturmechanismen. Einen wesentlichen Unterschied markiert die Effektivität der Schadensreparatur. So liegt die Quantenausbeute der CPD-Photolyasen mit 0.7-0.98 nahe am Optimum, während (6-4)-Photolyasen ihre Substrate nur mit deutlich geringerer Effizienz (0.05-0.10) reparieren [Hitomi, 1997; Kim, 1994]. Die in lebenden Organismen in einem ungefähren Verhältnis von 3:1 gebildeten CPD- und (6-4)-Photoschäden entstehen zwischen zwei auf einem DNA-Strang benachbarten Pyrimidinen, wobei Thymin deutlich bevorzugt reagieren.



**Abbildung 1.5:** Strukturen der in Photolyasen gebundenen Cofaktoren. Das vollständig reduzierte FADH<sup>-</sup> dient als universeller katalytischer Cofaktor. Die beiden Antennenchromophore 8-HDF in der Deazaflavinklasse und MTHF in der Folatklasse der Photolyasen ermöglichen eine Erweiterung des Aktionsspektrums und erhöhen die Quantenausbeute der DNA-Reparatur (R = Glutamat).

Eine weitere Einteilung der Photolyasen wird aufgrund der geringeren Sequenzhomologie zwischen den mikrobiellen und den tierischen Reparaturenzymen getroffen. Photolyasen der Klasse I mit einer Sequenzidentität von 25 bis 43 % sind weit verbreitet bei Eubakterien, Pilzen und Haloarchaea [McCready, 2003]. Die der Klasse II zugehörigen Photolyasen kommen hingegen in Eukaryonten, einigen Eubakterien [O'Connor, 1996] sowie einigen Pathogenen wie dem Pockenvirus vor [Bennett, 2003; Srinivasan, 2001] und besitzen

untereinander mit 38 bis 72 % eine noch deutlich höhere Sequenzidentität. Eine Funktion für die im Genom von verschiedenen Viren vorkommenden Photolyasen konnte bisher nicht gefunden werden [Srinivasan, 2001; Sancar, 2000; Afonso, 1999; Todo, 1999]. Der direkte Vergleich mit mehr als 50 bekannten Photolyasesequenzen aus Vertretern beider Klassen zeigt jedoch nur eine Sequenzidentität von 10-17 % zwischen den Klassen [Todo, 1999].

Alle bekannten Photolyasen sind monomere Proteine mit 420-550 Aminosäuren, die ein oder zwei nicht kovalent gebundene Chromophore in äquimolarer Menge enthalten. Flavinadenindinukleotid (FAD) fungiert als katalytisch aktiver Cofaktor. Als zweite, der Erhöhung der Quantenausbeute dienende Antennencofaktoren wurden bis zum Beginn dieser Arbeit 8-Hydroxy-5-deazaflavin (8-HDF) und Methenyltetrahydrofolat (MTHF) identifiziert (Abbildung 1.5). Sie konnten jedoch bisher nicht in allen bekannten Photolyasen nachgewiesen werden. Die Affinitäten der Antennencofaktoren zur jeweiligen Photolyase vom MTHF- oder 8-HDF-Typ sind jedoch im Vergleich zu FAD deutlich geringer, zudem ist der Antennenchromophor nicht essentiell für die katalysierte Reaktion [Jorns, 1990; Payne, 1990; Heelis, 1987]. Um eine präzisere Einteilung der Enzyme zu ermöglichen, wurden deshalb zusätzlich die Deazaflavin- und die Folattypen unterschieden.

#### **1.4.2. Der katalytische Cofaktor FAD**

Das in allen Photolyasen in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 gebundene FAD ist der essentielle Cofaktor für die spezifische Bindung von geschädigter DNA und den nachstehend zu durchlaufenden katalytischen Prozess der Enzyme [Sancar, 1984]. Ein Ersatz des sehr fest an das Protein gebundenen FAD durch ähnliche Flavine wie FMN oder Riboflavin mittels Rekonstitution gelang bisher nicht. Auch zeigt eine cofaktorfreie Photolyase keine Bindungsfähigkeit mehr für schadhafte DNA [Payne, 1990].

Bei der Expression in heterologen Systemen kann es zu substöchiometrischen Verhältnissen bis hin zum völligen Verlust des proteingebundenen FAD kommen [Hitomi, 1997; Zhao, 1997; Yasui, 1994].

Von den drei möglichen Redoxzuständen des FAD (oxidiert, ein-Elektronen-reduziert, zwei-Elektronen-reduziert) stellt ausschließlich das vollständig reduzierte FADH<sup>-</sup> die katalytisch aktive Spezies in Photolyasen dar [Malhotra, 1995; Payne, 1987; Sancar, 1984]. FAD wird zunächst in der oxidierten Form synthetisiert und in das Apoenzym eingebaut. Nach welchem Mechanismus der Cofaktor *in vivo* zu FADH<sup>-</sup> reduziert wird, ist unbekannt, da keine

lichtunabhängige Redoxreaktion von Photolyasen bekannt ist [Wang, 2005; Aubert, 2000]. FAD lässt sich jedoch photochemisch reduzieren, weshalb vermutet wird, dass dies auch *in vivo* mit noch nicht aktiven Photolyasen geschieht [Payne, 1990; Sancar, 1987].

### 1.4.3. Photoantennen

Der zweite von Photolyasen nichtkovalent gebundene Cofaktor ermöglicht eine Erhöhung der Reparaturrate um das zehn- bis hundertfache unter limitierten Lichtbedingungen, abhängig von der Wellenlänge, die für die Katalyse verwendet wird [Sancar, 2003]. Ein fünf- bis zehnfach höherer Extinktionskoeffizient als FADH<sup>•</sup> und Absorptionsmaxima bei größeren Wellenlängen im Vergleich zum vollständig reduzierten Flavin ermöglichen es dem Enzym durch den Einsatz des zweiten Chromophors als Antenne, ihr Aktionsspektrum auszuweiten. Eine Photolyase ist weder für die spezifische Bindung des Photoschadens noch für dessen Reparatur auf eine Photoantenne angewiesen. Ebenso wie das FAD sind auch die Antennenchromophore stöchiometrisch an das Apoenzym gebunden [Kiener, 1989; Eker, 1988]. Häufig kommt es jedoch durch die Expression in heterologen Systemen oder im Verlauf der Proteinaufreinigung zum teilweisen oder vollständigen Verlust der Antenne. In den meisten bisher untersuchten Photolyasen dient entweder ein Folat oder ein Deazaflavin als Antennenchromophor, nach dem auch die Subtypisierung innerhalb einer Klasse der Photolyasen vorgenommen wird.

Das Pterin Methenyltetrahydrofolat (MTHF) ist der in den meisten bekannten Photolyasen vorhandene Antennencofaktor. Bei der Expression der *E. coli* Photolyase variiert die Zahl der über die Amidbindung gebundenen Glutamatreste von drei bis sechs. Die 5,10-Methenylbrücke des Folats ist für die Absorption im nahen UV-Bereich bei 360 nm verantwortlich. Das proteingebundene Folat erfährt durch die hydrophoben Wechselwirkungen des Pterinrings mit der Bindungstasche des Enzyms eine Rotverschiebung zu größeren Wellenlängen, die von 377 nm in *S. cerevisiae* über 390 nm in *N. crassa* bis hin zu 415 nm in *B. firmus* Photolyase stark variieren [Eker, 1994; Malhotra, 1994; Sancar, 1987].

Der in der Klasse der Deazaflavin-Photolyasen vorhandene Antennencofaktor ist das 8-Hydroxy-7,8-didemethyl-5-deazariboflavin (8-HDF), welches in der Literatur auch bisweilen als F<sub>0</sub> bezeichnet wird. Bis zur Entdeckung des Zwei-Chromophorsystems 1984 in *E. coli* war 8-HDF der einzig bekannte Chromophor innerhalb der Deazaflavinklasse



[Johnson, 1988; Jorns, 1984; Sancar, 1984; Eker, 1981]. Auch nach dessen anfänglicher Erforschung galt das Deazaflavin noch einige Zeit als katalytisch aktiver Cofaktor für die Dimerspaltung, bis diese Funktion für das FAD universell bestätigt werden konnte [Eker, 1990]. Grund hierfür war, dass 8-HDF im angeregten Zustand ein starkes Ein-Elektronen-Reduktionsmittel ist und häufig der Reduktion von Flavoproteinen dient [Massey, 1978]. Alle in Photolyasen gebundenen Deazaflavine weisen aufgrund der starken Wechselwirkungen mit dem Apoenzym eine Rotverschiebung um 20 nm auf und besitzen damit ein ausgeprägtes Absorptionsmaximum bei 440 nm [Malhotra, 1994; Kiener, 1989; Eker, 1981].

#### **1.4.4. Bekannte Kristallstrukturen**

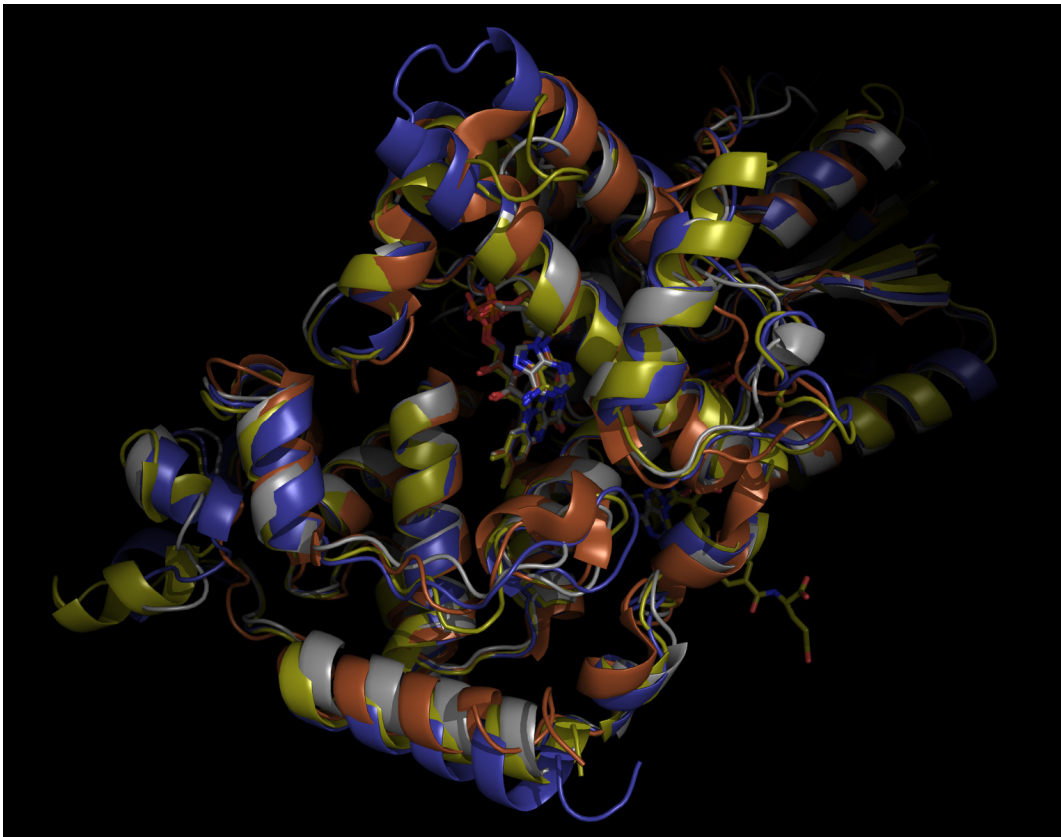
Bisher konnten ausschließlich Photolyasen der Klasse I strukturell charakterisiert werden (Tabelle 1.1). Darunter finden sich zwei Vertreter des Deazaflavintyps (*A. nidulans*, *T. thermophilus*) und die erste im Jahr 1995 von Park gelöste Photolyasestruktur des Enzyms aus *E. coli*, die dem Folat-Typ angehört [Komori, 2001; Tamada, 1997; Park, 1995]. Die Struktur einer Klasse I Photolyase aus dem archaealen Organismus *S. tokodaii* lieferte kürzlich erstmals den Nachweis, dass als Antennenchromophor ebenfalls FAD gebunden werden kann [Fujihashi, 2007]. Die Überlagerung der Strukturen (Abbildung 1.6) zeigt eine sehr hohe Ähnlichkeit, obwohl die Sequenzidentität der Klasse I Photolyasen bei nur etwa 25 % liegt.

Photolyasen bestehen aus zwei Domänen, einer N-terminalen  $\alpha/\beta$ -Domäne (*E. coli*: 1-131) und einer C-terminalen  $\alpha$ -helikalen Domäne (*E. coli*: 204-471), die durch einen Interdomänenloop (*E. coli*: 132-203), der um die  $\alpha/\beta$ -Domäne gewunden ist, miteinander verbunden sind.

Der katalytische Cofaktor FAD wird tief innerhalb der  $\alpha$ -helikalen Domäne gebunden und besitzt eine ungewöhnliche U-förmige Konformation, die Isoalloxazinrest und Adeninring in räumliche Nähe bringt. Die an Wechselwirkungen mit FAD beteiligten Aminosäuren sind innerhalb der Photolyase/Cryptochrom-Familie weitgehend konserviert [Komori, 2001; Park, 1995]. Das Flavin ist über eine kleine Öffnung in der Mitte der Bindungsdomäne von der Oberfläche aus zugänglich. Eine Diffusion aus dem Enzym heraus ist daher nicht möglich, jedoch besteht die Möglichkeit der Oxidation, was die leichte Oxidierbarkeit von  $\text{FADH}^\cdot$  zu  $\text{FADH}^\bullet$  in den meisten Photolyasen erklärt.

<i>Jahr</i>	<i>Organismus</i>	<i>PDB-code</i>	<i>Auflösung</i>	<i>Bemerkung</i>	<i>Referenz</i>
1995	<i>Escherichia coli</i>	1DNP	2.30 Å	Komplex mit MTHF-Antenne	[Park, 1995]
1998	<i>Anacystis nidulans</i>	1QNF	1.80 Å	Komplex mit 8-HDF-Antenne	[Tamada, 1997]
2001	<i>Thermus thermophilus</i>	1IQR	2.10 Å	kein Antennenpigment beobachtet (*)	[Komori, 2001]
2002	<i>Thermus thermophilus</i>	1IQU	2.20 Å	Komplex mit 2 Thyminen	[Komori, 2001]
2004	<i>Anacystis nidulans</i>	1OWL	1.80 Å	Apoenzym ohne 8-HDF-Antenne	[Kort, 2004]
2004	<i>Anacystis nidulans</i>	1OWM	2.30 Å	Apoenzym, Röntgendosis: $1.2 \cdot 10^{15}$ Photonen/mm <sup>2</sup>	[Kort, 2004]
2004	<i>Anacystis nidulans</i>	1OWN	2.30 Å	Apoenzym, Röntgendosis: $4.8 \cdot 10^{15}$ Photonen/mm <sup>2</sup>	[Kort, 2004]
2004	<i>Anacystis nidulans</i>	1OWO	2.30 Å	photoreduziertes Apoenzym, Röntgendosis: $1.2 \cdot 10^{15}$ Photonen/mm <sup>2</sup>	[Kort, 2004]
2004	<i>Anacystis nidulans</i>	1OWP	2.30 Å	photoreduziertes Apoenzym, Röntgendosis: $4.8 \cdot 10^{15}$ Photonen/mm <sup>2</sup>	[Kort, 2004]
2006	<i>Sulfolobus tokodaii</i>	2E0I	2.80 Å	Komplex mit FAD-Antenne	[Fujihashi, 2007]
2004	<i>Anacystis nidulans</i>	1TEZ	1.80 Å	Komplex mit CPD-haltiger dsDNA und 8-HDF-Antenne	[Mees, Klar, 2004]
2007	<i>Thermus thermophilus</i>	2J07	1.95 Å	Komplex mit 8-HDF-Antenne	[Klar, 2006]
2007	<i>Thermus thermophilus</i>	2J08	2.61 Å	Komplex mit 8-IRF-Antenne	[Klar, 2006]
2007	<i>Thermus thermophilus</i>	2J09	2.00 Å	Komplex mit FMN-Antenne	[Klar, 2006]

**Tabelle 1.1:** Bis zum Jahr 2007 veröffentlichte Röntgenkristallstrukturen von DNA-Photolyasen. (\*) Die Vermutung der von Komori *et al.* postulierten Bindung von 8-HDF in *T. thermophilus* Photolyase konnte durch eigene röntgenkristallographische Arbeiten bestätigt werden [Klar, 2006].



**Abbildung 1.6:** Überlagerung der vier bekannten Photolyasestrukturen aus *E. coli* (pdb-code: 1DNP, gelb), *A. nidulans* (pdb-code: 1QNF, blau), *T. thermophilus* (pdb-code: 2J09, rot) und *S. tokodaii* (pdb-code: 2E0I, weiß). Die enthaltenen Cofaktoren sind ebenfalls in den entsprechenden Farben gekennzeichnet.

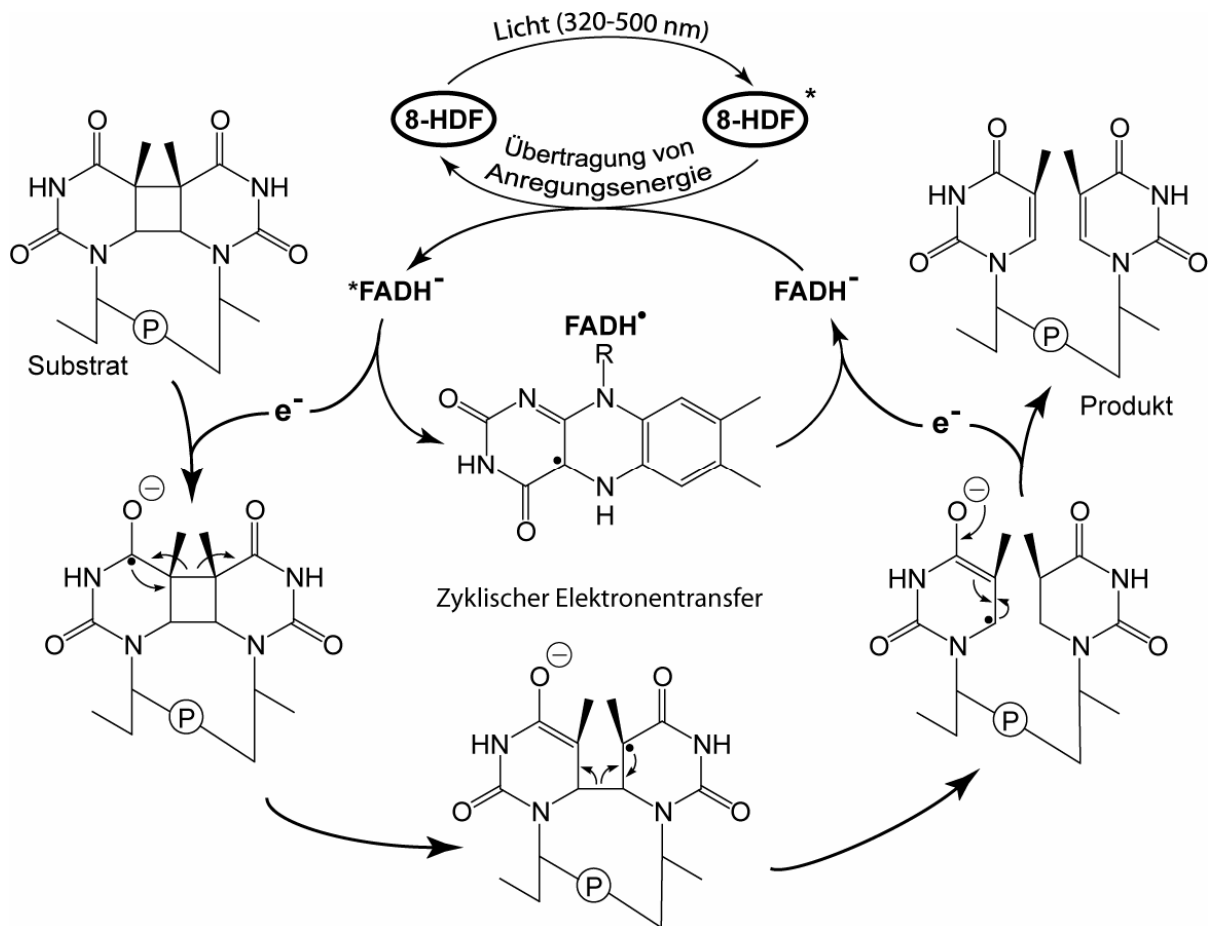
Der Antennencofaktor ist in einer tiefen Höhle zwischen den Domänen gebunden. Im Fall der *E. coli* Struktur ist diese Bindung des MTHF oberflächennah und unterstreicht die schwächere Bindung dieser Antenne an das Apoenzym im Vergleich zum Deazaflavintyp. Aminosäuren, die Kontakte mit dem Antennenchromophor ausbilden, sind zwischen dem Folat- und Deazaflavintyp oder Enzymen der gleichen Klasse nur teilweise konserviert [Komori, 2001; Deisenhofer, 2000].

Der Abstand der beiden senkrecht zueinander stehenden Ebenen der Cofaktoren beträgt, bezogen auf deren Zentren, bei der *E. coli* Photolyase 16.8 Å. Die günstigere Orientierung ihrer Dipolmomente im *A. nidulans* Enzym bewirkt eine höhere Effizienz des Energietransfers, obwohl der Abstand hier 17.5 Å beträgt.

### 1.4.5. Reparaturmechanismus der DNA-Photolyase

Der Mechanismus der Schadensreparatur durch Photolyasen lässt sich in mehrere Teilschritte gliedern (Abbildung 1.7). Zunächst findet eine lichtunabhängige Bindung des pyrimidindimerhaltigen DNA-Abschnitts an das Enzym unter Ausbildung eines stabilen Enzym-Substrat-Komplexes statt. In diesem wird das Dimer nach einem sogenannten *dinucleotid-flipping*-Mechanismus aus der Doppelhelix heraus in das aktive Zentrum des Enzyms hineingedreht [Komori, 2001]. Das Folat oder Deazaflavin absorbiert anschließend ein Photon ( $\lambda = 320\text{-}500\text{ nm}$ ) und transferiert dessen Anregungsenergie über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf das vollständig reduzierte Flavin. Das nun angeregte  $\text{FADH}^*$  injiziert ein Elektron auf das Dimer. Daraufhin werden die C5-C5- und die C6-C6-Bindungen des CPD gespalten und beide Pyrimidine regeneriert. Mit der Rückübertragung des Elektrons auf das  $\text{FADH}^*$  wird wieder  $\text{FADH}$  gebildet und der katalytische Zyklus geschlossen. Abschließend dissoziiert die reparierte DNA vom Enzym ab. Genau genommen ist der gesamte Vorgang dieser  $[2\pi+2\pi]$ -Cycloreversion keine Redoxreaktion, sondern ein photonengetriebener zyklischer Elektronentransfer, ohne Elektronengewinn oder -verlust.

Die Bindungsaffinität ist, wie für strukturspezifische, DNA-bindende Proteine zu erwarten, sequenzunabhängig [Svoboda, 1993]. Die Bindung der DNA sollte daher weniger durch benachbarte Sequenzen des DNA-Schadens als durch den Schaden selbst beeinflusst werden [Park, 1995]. CPDs in doppel- und einzelsträngiger DNA besitzen in *E. coli* Photolyase mit  $K_S=10^{-9}\text{ M}$  etwa die gleiche Affinität für das Enzym. Die unspezifische Bindung dieser Photolyase an nichtgeschädigte DNA ist hier mit  $K_{NS}=10^{-4}\text{ M}$  um einen Faktor von  $10^{-5}$  deutlich niedriger [Husain, 1987].



**Abbildung 1.7:** Modell der Cyclobutanpyrimidindimer-Reparatur durch zyklischen Elektronentransfer in CPD-Photolyasen. Im Anschluß an die lichtunabhängige Bindung des Substrats wird ein UV- oder Blaulichtphoton vom Antennencofaktor absorbiert und dessen Anregungsenergie auf ein vollständig reduziertes FADH<sup>-</sup> mittels Fluoreszenzenergietransfer übertragen. Das angeregte \*FADH<sup>-</sup> überträgt ein Elektron auf den Schaden, wodurch ein ladungsgetrenntes Radikalpaar entsteht. Durch die folgende Bindungsumbildung entstehen zwei Monomere als Produkt unter Elektronenrücktransfer auf das Flavinradikal und Regenerierung des katalytisch aktiven FADH<sup>-</sup>. Abbildung nach [Kavakli, 2004].

#### 1.4.6. Photoaktivierung

Die katalytisch aktive Photolyase benötigt ein vollständig reduziertes FADH<sup>-</sup>. Die lichtinduzierte Reduktion des Flavinradikals zum vollständig reduzierten Flavin wird durch eine mehrstufige Radikaltransferkaskade über drei Tryptophanreste in der C-terminalen Domäne erreicht (*E. coli*: W382->W359->W306), die auch in (6-4)-Photolyasen und Cryptochromen konserviert sind [Wang, 2005]. Ein genauer Einblick in diesen Vorgang konnte mit eingehenden EPR- und kurzszeitspektroskopischen Messungen gewonnen werden

[Aubert, 2000; Aubert, 1999].

Die Abstände zwischen den einzelnen Tryptophanen liegen in der untersuchten *A. nidulans* Photolyase bei 4.2, 5.2 bzw. 3.9 Å und sind sehr gut für einen Elektronentransfer geeignet. Der sehr schnelle Elektronentransfer nach Bestrahlung mit einem 7 ns langen Laserpuls bis zur Bildung des vollständig reduzierten FADH<sup>-</sup> und eines Tryptophanyl-Radikals erfolgte in weniger als 500 ns. Im Anschluss transferierte ein Tyrosin unter Ausbildung eines neutralen Tyrosyl-Radikals innerhalb von 50 µs ein Elektron auf das Tryptophanyl-Radikal. Das Tyrosyl-Radikal wurde dann bei Anwesenheit eines exogenen Elektronendonors in einer bimolekularen Reaktion erneut reduziert, die das FAD wieder in seinen vollständig reduzierten Zustand überführte.

Mutationsstudien an *E. coli* Photolyase, bei denen W306 gegen Alanin ausgetauscht wurde, bewirkt den vollständigen Verlust der Reduktionsfähigkeit für FADH<sup>-</sup> und belegt, dass die Seitenkette dieses Tryptophanrests in Photolyasen für die Photoreduktion des Flavins unter physiologischen Bedingungen essentiell ist. Das auf diese Weise modifizierte Enzym durchläuft etwa 25 Reparaturzyklen, bevor es seine Aktivität verliert [Kavakli, 2004].

### 1.5. Cryptochrome

Die ersten Cryptochrome wurden 1993 in *Arabidopsis thaliana* und *Sinapis alba* entdeckt [Ahmad, 1993; Batschauer, 1993]. Seitdem konnten sie in vielen Pflanzen, Tieren und Bakterien nachgewiesen werden und haben damit ebenso wie DNA-Photolyasen eine sehr weite Verbreitung in den verschiedenartigsten Organismen.

Per Definition besitzen Cryptochrome keine DNA-Reparaturaktivität, weisen aber zu den Photolyasen mit 25-40 % eine hohe Sequenzidentität auf [Cashmore, 1999; Lin, 1995; Ahmad, 1993]. Eine weitaus höhere Übereinstimmung findet sich besonders zwischen tierischen Cryptochromen und (6-4)Photolyasen (bis zu 50 % Sequenzidentität) sowie zwischen Cryptochromen des DASH-Typs und Klasse I CPD-Photolyasen (bis zu 30 % Sequenzidentität), was auf eine voneinander unabhängige Entwicklung in Pflanzen und Tieren hindeutet [Daiyasu, 2004; Brudler, 2003; Kleine, 2003]. Ein gemeinsamer Vorfahre der beiden Enzyme war möglicherweise in der Lage, DNA-Schäden mit Blaulicht als vorhandener Energiequelle zu reparieren sowie als Blaulichtrezeptor einige Signalkaskaden zu regulieren. Erst im Verlauf der Evolution erfolgte wahrscheinlich eine Diversifizierung zu Photolyasen und Cryptochromen. Phylogenetische Analysen lassen weiterhin den Schluss zu,

dass das Vorkommen von verschiedenen Cryptochromen im Genom von Pflanzen durch einen dualen horizontalen Gentransfer zustande kam [Kleine, 2003].

Strukturell weisen beide blaublichtaktiven Proteine gemeinsame Faltungsmuster auf und besitzen neben FAD, das für die Funktion des Enzyms essentiell ist, ein zusätzliches Antennenchromophor, um ihr Aktionsspektrum zu erweitern. In den bis 2004 veröffentlichten Cryptochromstrukturen [Brautigam, 2004; Brudler, 2003] konnte jedoch der in vielen Cryptochromen spektroskopisch oder massenspektrometrisch identifizierte Antennenchromophor MTHF [Saxena, 2005; Daiyasu, 2004; Malhotra, 1995] nicht nachgewiesen werden. Die ersten strukturellen Nachweise dieses zweiten Cofaktors gelangen erst kürzlich in *Arabidopsis thaliana* Cryptochrom 3 (Tabelle 1.2) [Klar, 2007; Huang, 2006]. Während der N-terminale Teil allgemein eine photolyaseähnliche Domäne aufweist, besitzt die 50-250 Aminosäuren lange C-terminale Domäne kinaseähnliche Eigenschaften und zeigt keine Sequenzhomologie zu Photolyasen [Ahmad, 1993].

<i>Jahr</i>	<i>Organismus</i>	<i>PDB-code</i>	<i>Auflösung</i>	<i>Bemerkung</i>	<i>Referenz</i>
2003	<i>Synechocystis sp.</i>	1NP7	1.90 Å	kein Antennenpigment beobachtet	[Brudler, 2003]
2004	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1U3C	2.60 Å	Photolyase-Domäne von Cry1, Apoprotein	[Brautigam, 2004]
2004	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1U3D	2.45 Å	Photolyase-Domäne von Cry1, Komplex mit AMPPNP	[Brautigam, 2004]
2006	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2IJG	2.10 Å	Cry3, Komplex mit MTHF-Antenne	[Huang, 2006]
2007	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2J4D	1.90 Å	Cry3, Komplex mit MTHF-Antenne	[Klar, 2007]

**Tabelle 1.2:** Bis zum Jahr 2007 veröffentlichte Röntgenkristallstrukturen von Cryptochromen.

Cryptochrome gehören zu den wichtigsten Blaublichtrezeptoren und steuern mit Hilfe von Blaublicht verschiedene Signalkaskaden in Pflanzen, Tieren, Pilzen und einigen Prokaryoten. So werden beispielsweise der circadiane Rhythmus regelmäßig mit Hell-Dunkel-Zyklen synchronisiert [Özgür, 2003; Stanewsky, 1998; Thresher, 1998; Hsu, 1996] sowie bei Pflanzen das Wachstum, die Blütezeit und das Hypocotylwachstum reguliert [Lin, 1995].

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass Cryptochrome generell keine Reparaturaktivität für DNA-Schäden zeigen. Erst im Jahr 2006 konnte bei *Vibrio cholerae* Cry1, einem Vertreter der sogenannten DASH-Cryptochrome, die eine höhere Sequenzhomologie zu *Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis* und humanen als zu bakteriellen Cryptochromen aufweisen, eine Reparaturaktivität für CPD-Schäden, die auf einzelsträngiger DNA lokalisiert sind, nachgewiesen werden [Selby, 2006]. Die Bezeichnung „DASH-Cryptochrom“ ist jedoch mittlerweile überholt, da CRY-DASH weder in *Drosophila* noch beim Menschen gefunden, jedoch in Cyanobakterien, nicht-photosynthetisch aktiven Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren nachgewiesen wurden [Lin, 2005].

Trotz intensiver Forschungsanstrengungen sind viele Funktionen und Wirkmechanismen der Cryptochrome bisher nur ansatzweise oder gar nicht bekannt [Bouly, 2007]. Die einzige bisher entdeckte und untersuchte photochemische Funktion ist die lichtabhängige Bindung von Cryptochrom an die beiden Clock-Proteine Per und Tim *in vivo* [Rosato, 2001; Ceriani, 1994]. Die Rolle des Cryptochrom in *Vibrio cholerae* ist bis dato ungeklärt, da dieser Organismus keinen circadianen Rhythmus aufweist.



## 1.6. Zielsetzung und Motivation

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten anfangs die bereits gegen Ende der eigenen Diplomarbeit [Klar, 2003] erhaltenen vorläufigen Strukturen der *T. thermophilus* Photolyase, die verschiedene Flavinanaloge enthalten, mit kristallographischen Methoden vollständig verfeinert werden. Um den Einfluss des Antennencofaktors auf die Reparaturaktivität der *Thermus* Photolyase zu untersuchen, lag ein Schwerpunkt zunächst auf der Generierung einer Mutante, die in der Bindungsregion so modifiziert war, dass die Bindung eines Cofaktors während der heterologen Expression in *E. coli* unterbleibt. Nach erfolgreicher Überexpression und Aufreinigung war zu klären, wie sich die Reparaturaktivität dieser Mutante im Vergleich zur nativen *Thermus* Photolyase bei verschiedenen Wellenlängen verhält. Da bereits bekannt war, dass das während der Photoaktivierung entstehende FADH<sup>-</sup> zu instabil ist und keine DNA-Reparatur mit dem herkömmlichen ELISA-Protokoll zu verzeichnen ist [Hada, 2000], sollte zudem ein speziell auf das Enzym abgestimmter ELISA-Assay etabliert werden.

Obwohl seit vielen Jahren intensiv an Photolyasen geforscht wird, gelang es bis zum Beginn dieser Arbeit lediglich, die Kristallstrukturen der drei Klasse I CPD-Photolyasen aus *E. coli* [Park, 1995], *A. nidulans* [Tamada, 1997] und *T. thermophilus* [Komori, 2001] zu lösen, wobei letztere keinen Antennencofaktor enthielt. Daher blieben entscheidende Details wie der Bindungsmechanismus oder die Hypothese eines *Dinukleotid-flipping*-Mechanismus, die durch die Cokristallstruktur der *Thermus* Photolyase mit einer gebundener Thyminbase im aktiven Zentrum [Komori, 2001] gestärkt und durch viele biochemische Daten [Christine, 2002; Vande Berg, 1998; Husain, 1987], molekulares Modelling [Antony, 2000; Sanders, 1999] und NMR-Spektroskopie [Torizawa, 2004] gefestigt wurde, unklar.

Mit der Erzeugung einer Cokristallstruktur von *A. nidulans* Photolyase, an die ein Thymindimeranalog enthaltende DNA gebunden ist, sollte in dieser Arbeit versucht werden, die oben genannten Fragestellungen zu beantworten und Hinweise auf den genauen Verlauf des photoinduzierten Elektronentransfermechanismus zu finden.

Ein weiterer Schwerpunkt sollte in der Kristallisation und der anschließenden Strukturbestimmung von *A. thaliana* Cryptochrom 3 (Cry3) liegen. Obwohl zwischen dem zur Cryptochrom-DASH-Klasse gehörenden Enzym und CPD-Photolyasen der Klasse I eine hohe Sequenzidentität besteht, ist seine Funktion bisher noch nicht geklärt.

Im Verlauf der Arbeit wurde durch die neue Erkenntnis der Reparaturspezifität für Einzelstrang-DNA in einem sogenannten DASH-Cryptochrom aus *Vibrio cholerae* [Selby, 2006] sowie in Verbindung mit den bereits erfolgreichen Aufklärungen der Cokristallstruktur

des *A. nidulans* Photolyase/DNA-Komplexes und der Struktur von *A. thaliana* Cry 3 die Zielsetzung erweitert. Die Cokristallisation und Strukturbestimmung von *A. thaliana* Cry3 mit einem pentameren Oligonukleotid, das ein Thymindimer enthält, sollte zeigen, ob der in der zuvor gelösten Cokristallstruktur beobachtete Bindungsmodus für DNA sowie der *Dinukleotid-flipping*-Mechanismus mit dem im Cry3/ssDNA-Komplex vergleichbar sind.

## 2. Material

### 2.1. Geräte

Gerät	Typenbezeichnung und Hersteller
ÄKTApurifier™ 100	bestehend aus: Box 900, Fraktionskollektor Frac 950, Monitor pH/C-900, Monitor UV-900 Pumpe P-900 ( <i>GE Healthcare</i> , Freiburg)
Analysenwaagen	LabStyl 54 ( <i>Mettler-Toledo</i> , Giessen) DeltaRange® PC2200 ( <i>Mettler-Toledo</i> , Giessen)
Autoklav	<i>Webeco</i> (Bad Schwartau) T-line™ ( <i>Fedegari</i> , Albuzzano, Italien)
Brutschrank	<i>New Brunswick</i> (N.Y., USA)
Cut-off Filter (320 nm)	<i>Schott</i> (Mainz)
Digitalkamera	Powershot A70 ( <i>Canon</i> , Krefeld)
Dokumentationssystem für Kristallisationsscreens	Crystal Pro HT 110 ( <i>TriTek Corporation</i> , Summerduck, USA)
Elektroporator	MicroPulser ( <i>Biorad</i> , München)
ELISA plate reader LambdaE	<i>MWG-Biotech</i> (Ebersberg)
Fluidizer	EmulsiFlex-C5 ( <i>Avestin</i> , Ottawa, Kanada)
FPLC-Anlage	<i>Pharmacia</i> FPLC-System 250 bestehend aus: Gradienten-Programmer GP-250 plus, Pumpe P-500 (2x), Uvicord Opt. Einheit UV-1 (mit 280 nm Filter), Uvicord Kontrolleinheit UV-1, 2-Kanal-Flachbettschreiber REC-102, Injektionsventil V-7, 3-Wege Magnetventil PSV-100, Fraktionssammler FRAC-100 ( <i>Pharmacia</i> , Freiburg)
French-Press	French Pressure Cell Press 5.1 ( <i>SLM Aminco</i> , Urbana, USA)
Geldokumentationssystem	Computer E.A.S.Y. (UVP), Kamera (UVP), UV-Schirm ( <i>Herolab</i> ), Thermodrucker UP-D 895 ( <i>Sony</i> , Berlin)
Gelelektrophorese	SDS-PAGE: Elektrophoresekammern und Gelträger für PAGE Mighty Small II SE250 ( <i>Hoefer Scientific</i> , San Francisco, USA) Spannungsversorgung EPS 300 ( <i>Pharmacia</i> , Freiburg)

	Agarosegele: Feinmechanik ( <i>Philipps-Universität, Marburg</i> )
Kapillarelektrophorese-System	P/ACE™ MDQ DNA System ( <i>Beckman Coulter, Krefeld</i> )
Kristallisationsroboter	Cartesian Microsys™ SQ4000 ( <i>Genomic Solutions, Huntingdon, GB</i> )
Mikroskope	B601 ( <i>Olympus, Hamburg</i> ) MZ8 ( <i>Leica, Wetzlar</i> )
pH-Meter	Digital pH-Meter pH525 ( <i>wtw, Weilheim</i> )
Pipetten	Research variabel ( <i>Eppendorf, Hamburg</i> )
Quarzküvetten	( <i>Hellma GmbH &amp; Co KG, Müllheim</i> )
Reinstwasseranlage	Seralpur Pro90CN ( <i>Seral, Celle</i> )
Robocycler	RoboCycler® 96 Gradient Cycler ( <i>Stratagene, La Jolla, CA, USA</i> )
Röntgendiffraktometer	Drehanode AXS FR591 ( <i>Bruker, Karlsruhe</i> ) und MAR345dtb Detektor ( <i>MAR Research, Norderstedt</i> ); Cryokühlung: <i>Oxford Cryosystems</i> (Oxford, GB)
Schlauchpumpe	Peristaltic pump P1 ( <i>Pharmacia, Freiburg</i> )
Schüttelinkubatoren	<i>New Brunswick</i> (N.Y., USA) EB SM25 und EB Swip ( <i>Edmund Bühler, Hechingen</i> ) Multitron 2 ( <i>Infors AG, Basel, Schweiz</i> )
Spektralphotometer	U-2000 ( <i>Hitachi, Tokio, Japan</i> ) UV-2401PC ( <i>Shimadzu Corp., Kyoto, Japan</i> )
Spektrofluorophotometer	FP-750 ( <i>Jasco, Tokio, Japan</i> ) RF-5301PC ( <i>Shimadzu Corp., Kyoto, Japan</i> )
Ultraschallgerät	Sonoplus HD200 mit Spitze Typ UW 200 ( <i>Bandelin electronic, Berlin</i> )
UV-Lampe	TL40/W12 ( <i>Philips, Hamburg</i> )
Wasserbad	NK22 ( <i>Haake, Karlsruhe</i> )
Zentrifugen	Centrifuge 5417 C ( <i>Eppendorf, Hamburg</i> ) Biofuge pico/fresco ( <i>Heraeus Kendro, Hanau</i> ) Sigma Laborzentrifuge 2-15 ( <i>B. Braun, Melsungen</i> )

**Tabelle 2.1:** Verwendete Geräte

## 2.2. Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Enzyme

Alle üblichen Chemikalien wurden, sofern nicht gesondert in Tabelle 2.2 aufgeführt, von den Firmen *Merck* (Darmstadt), *Sigma-Aldrich* (München) und *Roth* (Buchs, Schweiz) in p.a. Qualität bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Für Kristallisationsexperimente wurden ausschließlich Chemikalien der Firma *Fluka* in den Qualitäten BioChemika Ultra oder p.a. eingesetzt.

Produkt	Hersteller
Agarose	<i>Invitrogen Ltd.</i> (Paisley, UK)
Ammoniumchlorid	<i>J. T. Baker</i> (Griesheim)
Bradfordreagenz	<i>Biorad GmbH</i> (Hamburg)
BSA	<i>Applichem GmbH</i> (Darmstadt)
Coomassie-Brilliant Blue R-250	<i>Serva Electrophoresis GmbH</i> (Heidelberg)
Dialysemembranen	<i>Millipore</i> (Bad Schwalbach)
DNA-Marker peqGOLD Range Mix DNA-Leiter	<i>peqlab Biotechnologie GmbH</i> (Erlangen)
DTT	<i>Biomol GmbH</i> (Hamburg)
Einmalküvetten Plastibrand® PS	<i>BrandGmbH &amp; Co KG</i> (Weinheim)
Elektroporationsküvetten (2 mm gap)	<i>VWR</i> (Darmstadt)
Gelfiltrations-Kalibrierkit	<i>GE Healthcare</i> (Freiburg)
IPTG	<i>Duchefa</i> (Haarlem, NL)
Kanamycin	<i>AppliChem GmbH</i> (Darmstadt)
Kristallisationsscreens	<i>Sigma</i> (München) <i>Nextal Biotechnologies Inc.</i> (Hilden)
Kristallisationszubehör	
VIEWseal™-Klebefolien, 96 well	<i>GreinerBioOne</i> (Frickenhäusen)
CrystalQuick™-Platten	
Deckgläser (21 mm Durchmesser), VDX-Platten, Cryoschleifen und Zubehör	<i>Hampton Research</i> (Aliso Viejo, CA, USA)
24 well plate 1 mL	<i>Nextal Biotechnologies Inc.</i> (Hilden)

Lysozym	<i>Boehringer Mannheim GmbH</i> (Mannheim)
Microlon ELISA-Platten	<i>GreinerBioOne</i> (Frickenhäusen)
Molekularbiologische Enzyme	<i>New England Biolabs</i> (Frankfurt/Main)
Nährmedien	<i>Difco Laboratories</i> (Detroit, USA)
Plasmid Mini & Midi Kits	<i>Qiagen GmbH</i> (Hilden)
Primärer Anti T $\phi$ T-Antikörper, clone KTM53	<i>Kamiya Biomedical Company</i> (Seattle, WA, USA)
Proteinkonzentratoren	<i>Millipore</i> (Bad Schwalbach) <i>VivaScience</i> (Hannover)
Proteinmarker peqGOLD Protein-Marker-I	<i>peqlab Biotechnologie GmbH</i> (Erlangen)
QIAquick Gel Extraction Kit	<i>Qiagen GmbH</i> (Hilden)
Roseoflavin	<i>Toronto Research Chemicals Inc.</i> (Toronto, Kanada)
Säulenmaterialien	<i>GE Healthcare</i> (Freiburg)
Sterilfilter	<i>Millipore</i> (Bad Schwalbach)
Ultrafree MC-Säulen	<i>Millipore</i> (Bad Schwalbach)

**Tabelle 2.2:** Verwendete Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Enzyme.

## 2.3. Vektoren

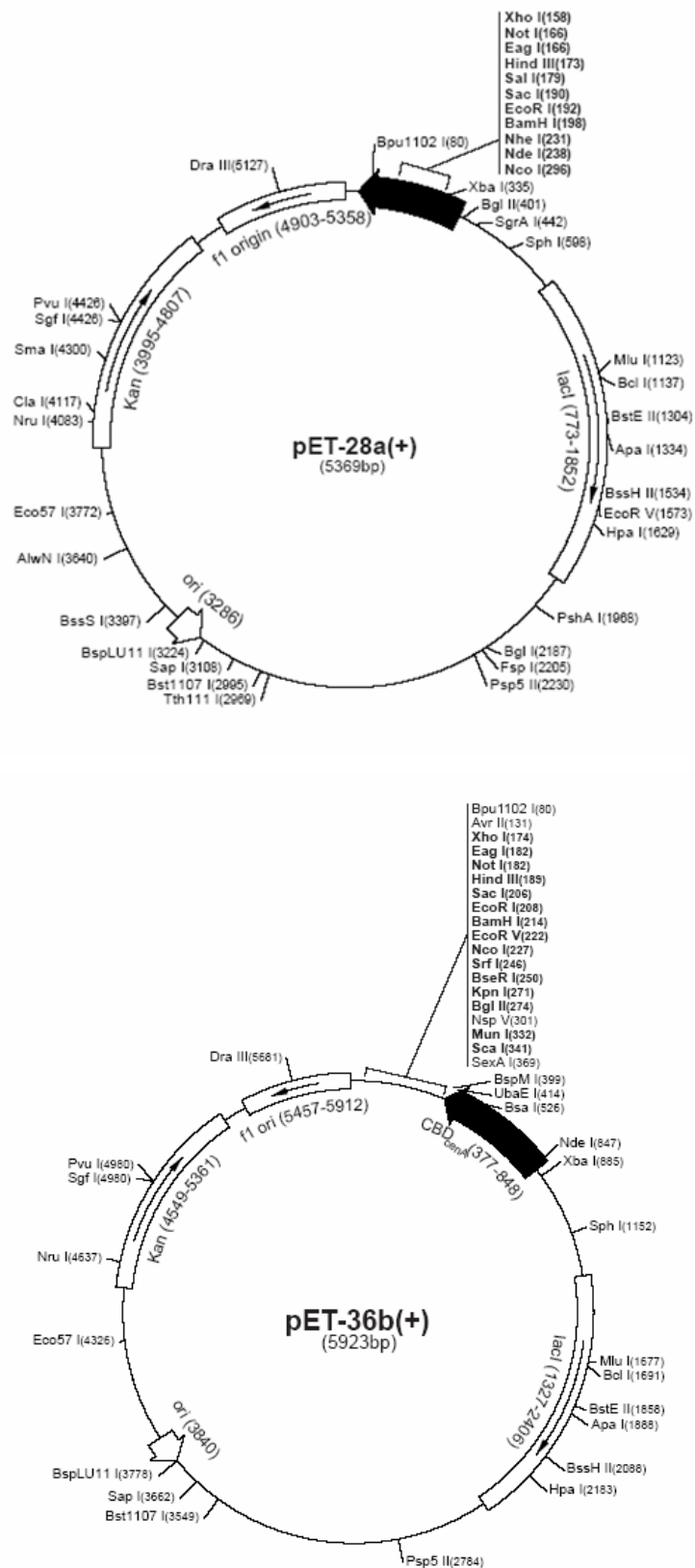


Abbildung 2.1: Verwendete Vektoren

## 2.4. Mikroorganismen

### 2.4.1. E. coli DH5 $\alpha$

Genotyp: *supE44  $\Delta$ lacU169 f80 lacZ $\Delta$ M15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*

Aufgrund seiner hohen Transformationseffizienz wird dieser Stamm zur Transformation von Ligationsansätzen und zur Propagation von Plasmiden eingesetzt. Von diesem Stamm wurden elektrokompente Zellen zur Transformation von Ligationsansätzen und chemisch kompetente Zellen zur Retransformation von vorhandenen Plasmiden eingesetzt.

### 2.4.2. E. coli XL1-Blue Superkompetente Zellen

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI<sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]*

Der *Escherichia coli* XL1-Blue Stamm wurde für Klonierungsexperimente bei der QuikChange<sup>®</sup> Site Directed Mutagenese verwendet.

### 2.4.3. E.coli BL21(DE3)-GOLD

Genotyp: B strain F<sup>-</sup> *ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal $\lambda$ (DE3) endA Hte*

Der *E. coli* Stamm BL21(DE3) mit dem Genotyp F<sup>-</sup> *ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)* ist als bakterieller Wirtsorganismus zur Genexpression von Plasmiden mit T7-Promotor bekannt und zeichnet sich durch einen Mangel an *lon* (Protease) und *ompT* (Protease der Außenmembran) aus. Eine weitere Besonderheit ist eine IPTG-induzierbare T7-RNA-Polymerase, deren Strukturgen nach *lacZ* und dem *lacUV5* Promotor auf dem Prophagen DE3 im Chromosom des Stammes inseriert ist. Dies schafft die Voraussetzung, um für Gene unter T7-Promotorkontrolle ebenfalls eine mit IPTG induzierbare Expression zu erreichen.



#### 2.4.4. *E. coli* BL21-Codon-Plus® (DE3)-RIL

Genotyp: B strain F<sup>-</sup> *ompT* hsdS(*r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>*) *dcm*<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> galλ(DE3) *endA* Hte [argU ileY leuW Cam<sup>r</sup>]

Der Aufbau des *E. coli* Stammes BL21-Codon-Plus®(DE3)-RIL ist grundsätzlich identisch mit dem des *E. coli* BL21(DE3)-GOLD Stammes. Um eine effizientere heterologe Proteinexpression in *E. coli* Zellen zu ermöglichen, die durch die erhöhte Anzahl bestimmter seltener tRNAs des Wirtsorganismus erreicht werden kann, sind in diesem Stamm zusätzliche Kopien der *argU*, *ileY* und *leuW* tRNA-Gene enthalten.

### 2.5. Kulturmedien

Die unten aufgeführten Mengen der jeweiligen Medien wurden, sofern nicht anders angegeben, mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt und bei 121 °C und 1.5 bar für 30 min im Autoklav sterilisiert. Für die Herstellung von Agarplatten wurden 20 g·L<sup>-1</sup> Agar mitautoklaviert. Eine entsprechende Menge des benötigten Antibiotikums wurde nach Abkühlen des Mediums auf 50 °C als sterile 1000-fache Stocklösung zugesetzt.

LB-Medium (Luria Bertani)
10 g Bacto-Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g Natriumchlorid
0.4 mL 10 M Natriumhydroxid
mit dest. H <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen
autoklavieren

LB-Medium-Glycerin
10 g Bacto-Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g Natriumchlorid
400 mL Glycerin (87 % v/v)
mit dest. H <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen
autoklavieren

---

**NZY<sup>+</sup>-Medium**

---

<i>I</i>	<i>II</i>
10 g NZ Amin (Caseinhydrolysat)	12.5 mL 1 M MgCl <sub>2</sub>
5 g Hefeextrakt	12.5 mL 1 M MgSO <sub>4</sub>
5 g Natriumchlorid	20 mL 20 % (w/v) Glucose
mit dest. H <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen	
pH-Wert mit NaOH auf 7.5 einstellen	einzelnen sterilfiltrieren und nach dem
autoklavieren	Autoklavieren von <i>I</i> zugeben

---



---

**TB-Medium (Terrific Broth)**

---

<i>Medium</i>	<i>Phosphatpuffer</i>
12 g Bacto-Pepton	0.17 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
24 g Hefeextrakt	0.72 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
4 mL Glycerin (87 % v/v)	
mit dest. H <sub>2</sub> O auf 900 mL auffüllen	mit dest H <sub>2</sub> O auf 100 mL auffüllen
autoklavieren	autoklavieren, zum Medium geben

---



---

**SOC-Medium**

---

20 g Bacto-Trypton
5 g Hefeextrakt
0.5 g NaCl
10 mL KCl-Lösung (250 mM)
mit dest. H <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen
pH-Wert mit NaOH auf 7.0 einstellen
autoklavieren
20 mL Glucose (1 M, sterilfiltriert)

---

**2.6. Antibiotika**

<b>Antibiotikum</b>	<b>Endkonzentration [<math>\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}</math>]</b>
Ampicillin	100
Chloramphenicol	50
Kanamycin	35

### 3. Methoden

#### 3.1. Allgemeiner Teil

Alle durchgeführten Arbeitsschritte wurden, sofern dies erforderlich war, unter sterilen Bedingungen ausgeführt, ohne dass dies bei den einzelnen Beschreibungen der Methoden explizit angegeben ist. Dies gilt im Besonderen für die Herstellung von Medien, Anzucht von Bakterienkulturen, molekularbiologischen und proteinchemischen Arbeiten.

#### 3.2. Molekularbiologische Methoden

Das folgende Kapitel enthält Erläuterungen zu den angewandten molekularbiologischen Methoden. Sämtliche Arbeiten mit Mikroorganismen wurden gemäß Gentechnikgesetz (GenTG) vom 20.05.1990 durchgeführt und fielen unter die Sicherheitsstufe S1. Alle bei den Arbeiten mit Bakterien kontaminierten Lösungen und Gefäße wurden 60 min bei 121 °C und einem Druck von 1.5 bar inaktiviert.

##### 3.2.1. Primersynthese

Die Synthese der verwendeten Primer wurde von der Firma *Invitrogen* in Karlsruhe durchgeführt. Für die Cokristallisationsexperimente benötigte Gegenstränge für CPD-haltige DNA wurden in HPLC-Qualität von der Firma *Metabion* (Martinsried) bezogen.

##### 3.2.2. Annealing synthetisierter Oligonukleotide

Für die Hybridisierung von zwei Oligonukleotiden wurden diese zunächst in destilliertem Wasser gelöst, in stöchiometrischem Verhältnis zusammen in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß gegeben und danach in einem Heizblock bei 95 °C erhitzt. Nach Abschaltung des Heizblocks erfolgte die Hybridisierung der beiden Oligonukleotidstränge über Nacht.

### 3.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion [Mullis, 1987] ermöglicht es, eine ausgewählte DNA-Sequenz zu vervielfältigen, ohne einen lebenden Organismus zu verwenden, sofern die Sequenzen benachbarter Bereiche bekannt sind. Die Methode nutzt die Eigenschaften von DNA-Polymerasen aus verschiedenen thermophilen Organismen, DNA bei hohen Temperaturen duplizieren zu können. Um später eine bessere Reinigung des Genprodukts zu ermöglichen, können weiterhin Restriktionsschnittstellen und Affinitätstags an einem oder beiden Enden der Gensequenz eingeführt werden. Der Einsatz von Primern, die an spezifischen Positionen nicht der Sequenz des zugrunde liegenden Templat entsprechen, erlaubt es außerdem, Mutationen in das PCR-Produkt zu integrieren.

Die in drei Stufen unterteilbare Gesamtreaktion gliedert sich in Denaturierung, Primeranlagerung an das Templat und schließlich dessen Elongation. Im ersten Schritt erfolgt die Zerlegung der DNA in ihre Einzelstränge bei Temperaturen von 92-98 °C. Die folgende schnelle Abkühlung auf eine spezifische Temperatur führt zur Hybridisierung der beiden im Reaktionsansatz vorliegenden Primer mit der denaturierten Templat-DNA. Für die Berechnung der spezifischen Hybridisierungstemperatur werden sowohl der GC-Gehalt der eingesetzten Primer als auch deren Länge herangezogen:

$$T = 59.9 + 41 \times GC\text{-Gehalt} - (675/Primerlänge)$$

Die anschließende Temperaturerhöhung auf die optimale Arbeitstemperatur der verwendeten Polymerase gewährleistet die rasche Elongation der Primer mit den zugesetzten dNTPs (1-2 kb·min<sup>-1</sup>). Die Elongationszeit richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments und muss dementsprechend angepasst werden. Nach der Elongation wird der Reaktionsansatz wieder stark erhitzt, um die DNA erneut in ihre Einzelstränge zu zerlegen. Gewöhnlich werden im Verlauf einer PCR 20-30 dieser Zyklen durchlaufen.

### 3.2.4. Reinigung von PCR-Fragmenten

Um eine Beeinträchtigung nachfolgender Arbeitsschritte durch Verunreinigungen der amplifizierten DNA aus PCR-Ansätzen (Enzyme, Nukleotide, Primer, Templat-DNA, Salze) auszuschließen, muss eine Aufarbeitung der Reaktionsansätze erfolgen. Enzyme, Salze und

kleinere DNA-Fragmente bis zu einer Länge von etwa 40 Nukleotiden können mit Hilfe der QIAquick PCR Purification Kits (*Qiagen*) entfernt werden. Bei Vorhandensein einer hohen Salzkonzentration und eines niedrigen pH-Werts wird die DNA an die Silica-Membran einer Säule gebunden, während die Kontaminationen unter diesen Bedingungen nicht erfasst werden. Die Verunreinigungen werden ausgewaschen und die DNA im Anschluss mit Nidrigsalzpuffer eluiert.

Der PCR-Ansatz wurde mit dem fünffachen Volumen Bindepuffer (PB-Puffer) versetzt, auf eine QIAquick spin Säule aufgetragen und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation (5000 rpm, 60 s, RT) wurde der Durchfluss verworfen und die Säulenmatrix mit 750 µL Waschpuffer (PE-Puffer) erneut für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Zentrifugation (5000 rpm, 60 s, RT) wurde nach Entfernung des Durchflusses einmal wiederholt (13000 rpm, 60 s, RT). Dann wurde die Matrix im Heizblock getrocknet (10 min, 37 °C). Die DNA wurde nach der Applikation von 50 µL Elutionspuffer (EB-Puffer) und fünfminütiger Inkubationszeit bei RT durch Zentrifugation (13000 rpm, 60 s, RT) eluiert.

#### **3.2.5. Einfache Reinigung von Plasmid-DNA**

Bei der auch unter dem Namen "*quick and dirty*" bekannten Methode handelt es sich um eine relativ schnelle Methode, um DNA zu präparieren. Die erhaltene Reinheit ist im Allgemeinen ausreichend für Restriktionsverdaue mit Restriktionsendonukleasen und für Retransformationen in *E. coli* DH5α Zellen oder verschiedene *E. coli* BL21(DE3) Stämme.

2 mL einer *E. coli*-Übernachtskultur werden pelletiert (13.000 rpm, 5 min, RT) und der Überstand verworfen. Das erhaltene Pellet wird in 250 µL Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µL Puffer P2 wird die Probe durch mehrmaliges Invertieren gemischt und bis zur vollständigen Lyse und Erhalten einer klaren Lösung bei RT für maximal 5 min inkubiert. Anschließend wird die Probe durch 250 µL gekühlten Puffer P3 neutralisiert und nach gründlichem Mischen für 10 min auf Eis inkubiert. Dann wird das Gemisch zentrifugiert (13.000 rpm, 15 min, RT) und der erhaltene klare Überstand in neue 1.5 mL Reaktionsgefäße überführt. Die Plasmid-DNA wird mit 0.7 Volumen Isopropanol versetzt, gemischt und zentrifugiert (13.000 rpm, 30 min, RT). Das die Plasmid-DNA enthaltende Pellet wird einmal mit 500 µL 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und bei 37 °C für 5 min getrocknet. Das gereinigte Pellet wird in 20-40 µL EB-Puffer aufgenommen.

<b>P1</b>		<b>P2</b>	
50 mM	Tris-HCl, pH 8.0	200 mM	NaOH
10 mM	EDTA	1 % (w/v)	SDS
100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	RNase A		

<b>P3</b>		<b>EB-Puffer</b>	
2.55 M	KOAc	10 mM	Tris-HCl, pH 8.5

### 3.2.6. Mini-Plasmidpräparation mit QIAprepSpin-Säulen

Diese Methode liefert durch die Reinigung der Plasmid-DNA über Anionentauschersäulen einen höheren Reinheitsgrad als die Fällung mit Alkohol (siehe Kapitel 3.2.5) und ist daher auch für weitere Klonierungen oder Sequenzierungen geeignet. Das hierbei verwendete Protokoll ist bis zur Lyse mit Puffer P2 identisch. Es folgt eine Versetzung mit 350  $\mu\text{L}$  Guanidiniumchlorid und Essigsäure-haltigem Puffer N3, Durchmischung und 15-minütige Inkubation auf Eis. Ausgefällte Proteine und chromosomale DNA werden nun abgetrennt (13.000 rpm, 15 min, RT) und der Überstand unter den Hochsalzbedingungen auf eine QIAprep spin Säule (Qiagen) aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wird zentrifugiert (5.000 rpm, 60 s, RT) und der Durchfluss verworfen. Die Säule wird mit 750  $\mu\text{L}$  PE-Waschpuffer für weitere 5 min inkubiert und danach zentrifugiert (5.000 rpm, 30 s, RT). Der Durchfluss wird verworfen und die Säule erneut zentrifugiert (13.000 rpm, 1 min, RT), um restlichen Waschpuffer zu entfernen. Nach Trocknung der Membran für 5 min bei 37 °C wird die DNA mit 50  $\mu\text{L}$  auf 60 °C erwärmtem EB-Puffer nach fünfminütiger Inkubation bei RT durch Zentrifugation (13.000 rpm, 60 s, RT) eluiert.

#### 3.2.7. Midi-Plasmidpräparation mit Qiagen tip-100 Anionentauschersäulen

Sollen größere Mengen an Plasmid-DNA (25-100 mL Kulturvolumen) präpariert werden, eignet sich besonders die Aufreinigung der DNA über einen Anionentauscher im Midi-Format. Zunächst wird eine 3 mL Starterkultur mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und mit der entsprechenden Menge eines geeigneten Selektionsmarkers angezogen (250 rpm, 8 h, 37 °C). Mit dieser Starterkultur wird dann eine 100 mL Kultur im Verhältnis  $1/500$  angeimpft und über Nacht inkubiert (250 rpm, 37 °C). Am nächsten Tag werden die Zellen geerntet und das erhaltene Pellet in 4 mL Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 mL Puffer P2 wird die Probe durch mehrmaliges Invertieren gemischt und bis zur vollständigen Lyse und Erhalten einer klaren Lösung bei RT für maximal 5 min inkubiert. Anschließend wird die Probe durch 4 mL gekühlten Puffer P3 neutralisiert und nach gründlichem Mischen für 10 min auf Eis inkubiert. Die Probe wird in 2 mL Reaktionsgefäße aufgeteilt und Proteine, chromosomale DNA und Zelltrümmer durch Zentrifugation (13.000 rpm, 30 min, 4 °C) pelletiert. Der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand wird auf eine mit 4 mL QBT-Puffer äquilibrierte QIAGEN-tip 100-Säule appliziert und der Durchfluss verworfen. Nachdem die Säule zweimal mit je 10 mL QC-Puffer gewaschen wurde, erfolgt die Elution der DNA mit 5 mL QF-Puffer. Um mit der relativ verdünnt von der Säule eluierten DNA weiterarbeiten zu können, schließt sich ein Konzentrierungsschritt an. Hierzu wird die DNA mit 3.5 mL (0.7 Vol) Isopropanol versetzt und nach Mischen in sechs 1.5 mL Reaktionsgefäßen zentrifugiert (13.000 rpm, 30 min, 4 °C). Die Überstände werden verworfen und die erhaltenen Pellets mit je 300 µL 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Die Pellets werden nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 37 °C getrocknet und die DNA im Anschluss in 50 µL EB-Puffer aufgenommen.

#### 3.2.8. Aufkonzentrieren von DNA durch Ethanol oder Isopropanol

Zu der zu konzentrierenden DNA-Lösung wird  $1/10$  des Volumens an 3 M Natriumacetatlösung, pH 4.8 hinzugegeben, vortexiert und mit 2 Vol. eiskaltem absoluten Ethanol oder 1 Vol. eiskaltem Isopropanol gefällt. Die Probe wird für 60 min auf Eis inkubiert und die gefällte DNA im Anschluss pelletiert (13.000 rpm, 30 min, 4 °C). Nach vorsichtiger Abnahme des Überstandes wird das Pellet mit 500 µL 80 % Ethanol gewaschen, die Probe rezentrifugiert und der Überstand verworfen. Um restliches Ethanol zu entfernen,



wird das Pellet bei 37 °C getrocknet und schließlich in einem geeigneten Volumen Puffer aufgenommen.

### **3.2.9. Hydrolytische Spaltung von DNA**

Für die hydrolytische Spaltung der Phosphodiesterbindung von DNA wurden Typ II Restriktionsendonukleasen verwendet. Diese erkennen und spalten spezifische, zumeist palindromische Tetra- oder Hexanukleotidsequenzen. Es entstehen je nach verwendetem Enzym glatte (*blunt ends*) oder 5'- bzw. 3'-überhängende Enden (*sticky ends*). Endonukleasen wurden sowohl für analytische als auch für präparative Anwendungen benutzt.

Analytische Restriktionsverdaue wurden in 25 µL-Ansätzen, präparative in 50 µL-Ansätzen durchgeführt. Gemäß den Angaben des Herstellers ist die DNA mit 1 bis 1.5 µL Enzym sowie der entsprechenden Menge Reaktionspuffer versetzt und der Ansatz mit ddH<sub>2</sub>O auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt worden. Die Inkubationszeit betrug 2 h für analytische und 4 h für präparative Verdaue bei einer Temperatur von 37 °C. Um die zugegebenen Enzyme zu inaktivieren, wurden die präparativen Verdaue vor der weiteren Verwendung 10 min einer Temperatur von 65 °C ausgesetzt.

### **3.2.10. Ligation**

Für die Ligation von Insert- und Vektor-DNA wurde T4-Phagen-DNA-Ligase eingesetzt. Das Enzym katalysiert in Gegenwart von ATP die Knüpfung von Phosphodiesterbindungen zwischen freien 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen doppelsträngiger DNA.

Das Insert wurde im 5-fachen Überschuss gegenüber dem Vektor zugesetzt, wobei die molaren Mengenverhältnisse quantitativ durch ein Agarosegel abgeschätzt wurden. Ein typischer Ligationsansatz beinhaltete 1 µL Ligase, hatte 20 µL Gesamtvolumen und wurde 16 h bei 16 °C im Wasserbad inkubiert.

---

**Ligasepuffer (10x Stammlösung)**

---

660 mM Tris-HCl, pH 7.6

66 mM MgCl<sub>2</sub>

100 mM DTT

660 µM ATP

---

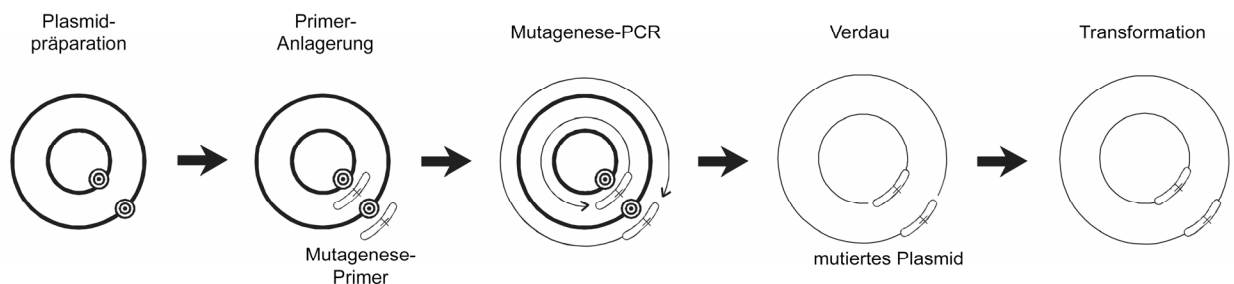
#### 3.2.11. Entsalzung von Ligationsansätzen

Alle Ligationen, die einer Elektrotransformation zugeführt wurden, mussten vorher einer Dialyse unterzogen werden, da dieser Vorgang unter salzfreien Bedingungen stattfinden soll. Die Ligationsansätze wurden daher auf Dialysemembranen der Porengröße 0.025 µm gegen ddH<sub>2</sub>O dialysiert (30 min, RT).

#### 3.2.12. Ortsspezifische Mutagenese

Für die Durchführung ortsspezifischer Mutagenese einzelner Aminosäuren in vitro wurde das *QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis*-Kit der Firma *Stratagene* verwendet, welches die gezielte Mutation doppelsträngiger DNA ermöglicht, ohne dass in M13-Bakteriophagen-Vektoren zwischenkloniert oder einzelsträngige DNA aufgearbeitet werden muss [Papworth, 1996]. Zusammen mit doppelsträngiger Plasmid-DNA werden zwei zueinander revers-komplementäre Primer, die die gewünschte Mutation tragen und die ebenfalls im Kit enthaltene *PfuTurbo<sup>®</sup>*-DNA-Polymerase verwendet. Im Vergleich zur Taq-DNA-Polymerase besitzt diese Polymerase eine sechsfach geringere Fehlerrate und ist daher in der Lage, auch längere DNA-Abschnitte fehlerfrei zu replizieren. Nach durchgeführter Mutagenese-PCR wird selektiv im Reaktionsansatz vorhandene methylierte Eltern-DNA durch Verdau mit Endonuklease DpnI (Erkennungssequenz: 5'-Gm<sup>6</sup>ATC-3') abgebaut. Die Effizienz der Mutagenesereaktion wird über Transformation des dem Kit beigelegten pWhitescript<sup>™</sup>-Kontrollplasmids (4.5 kb) in chemisch kompetente XL1-Blue-Zellen kontrolliert. Das pWhitescript<sup>™</sup>-Plasmid enthält inmitten eines für β-Galaktosidase kodierenden Genabschnitts ein Stoppcodon. Nach Transformation in XL1-Blue-Zellen erscheinen die daraus resultierenden Bakterienkolonien auf IPTG und X-gal enthaltenden LB-Ampicillin-

Agarplatten weiß. Parallel zu der gewünschten Mutagenese-PCR wurde dieses Plasmid unter Verwendung der mitgelieferten Kontrollprimer amplifiziert. Das oben erwähnte Stoppcodon wird dabei durch die Primer in ein für Glutamin codierendes Basentriplett zurückmutiert und damit die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität zurückerlangt. Das Verhältnis der auf den Agarplatten wachsenden blauen bzw. weißen Kolonien ist ein Hinweis auf die Effizienz der durchgeführten Mutagenesereaktion.



**Abbildung 3.1:** Schematische Übersicht der einzelnen Teilschritte einer ortsspezifischen Mutagenese

Im ersten Schritt wurde die für die Reaktion benötigte Plasmid-DNA mit QIAprep spin®-Säulen aufgereinigt und entsprechend verdünnt. Es folgte die Amplifikation des Plasmid mittels der die gewünschte Mutation enthaltenden Primer. Da die *PfuTurbo*®-DNA-Polymerase die Oligonukleotide verlängert, ohne sie zu ersetzen, enthält die amplifizierte Plasmid-DNA neben der gewünschten Mutation auch Einzelstrangbrüche.

Um nach erfolgreicher PCR die Templat-DNA aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, wurde ohne weitere Aufreinigung 1  $\mu$ L DpnI zugegeben und dadurch methylierte, nichtmutierte Eltern-DNA für 1 h bei 37 °C verdaut. Im letzten Schritt wurde 1  $\mu$ L des verdauten Mutageneseansatzes zu 50  $\mu$ L chemisch kompetenten XL1-Blue-Zellen gegeben, diese für 30 min auf Eis inkubiert und im Anschluss für 45 sec bei 42 °C durch Hitzeschock transformiert. Direkt nach der Transformation erfolgte eine zweiminütige Abkühlung des Transformationsansatzes auf Eis, bevor 0.5 mL vorgewärmtes NZY<sup>+</sup>-Medium zugegeben und die Zellen regeneriert wurden (1 h, 37 °C, 250 rpm). Die Zellen wurden nach Abschluss der Regeneration pelletiert, in 200  $\mu$ L des überstehenden Mediums resuspendiert und auf kanamycinhaltigen LB-Agarplatten (35  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> Kanamycin) ausgestrichen. Die Platten wurden für 16 bis 18 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

**3.2.13. Agarosegelelektrophorese**

Durch Agarosegelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente ihrer Größe nach auftrennen und visualisieren. Die Visualisierung beruht auf der Interkalierung von Ethidiumbromid zwischen GC-Basenpaare in die doppelsträngige DNA. Der gebildete Komplex fluoresziert unter UV-Bestrahlung im sichtbaren Bereich. Als Größenstandard wurde die peqGOLD Range Mix DNA-Leiter (*peqLab*) verwendet.

Die Herstellung eines typischen Agarosegels erfolgte standardisiert durch Zugabe von 1.0 % (w/v) Agarose-LE zu einer entsprechenden Menge von TBE-Puffer. Das Gemisch wurde in einer Mikrowelle bis zum Erhalten einer klaren Lösung erhitzt. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C erfolgte das Gießen in eine horizontale Gelelektrophoresekammer mit zuvor eingesetztem Probenkamm. Das ausgehärtete Gel wurde mit TBE-Puffer überschichtet und der Probenkamm entfernt. DNA-Proben wurden im Verhältnis 1:5 (v/v) mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Für analytische Zwecke wurde die Elektrophorese bei einer Stromstärke von 100 mA durchgeführt. Bei präparativen Anwendungen lag die Stromstärke hingegen bei 60 bis 80 mA. Anhand des im DNA-Probenpuffer enthaltenen Farbstoffs, der sich etwa auf der Höhe von DNA-Fragmenten mit 300 bps Länge bewegt, konnte das Fortschreiten der Elektrophorese visuell verfolgt werden. Im Anschluss erfolgte ein 15-minütiges Anfärben des Gels in einem Ethidiumbromidbad. Die auf diese Weise angefärbten DNA-Fragmente konnten nun unter UV-Licht ( $\lambda = 256 \text{ nm}$ ) als fluoreszierende Banden ( $\lambda = 590 \text{ nm}$ ) photographiert bzw. ausgeschnitten werden.

10 x TBE-Puffer	6 x DNA Probenpuffer
1 M Tris	0.25 % (w/v) Xylenxyanol FF
1 M Borsäure	1.5 % (w/v) Ficoll 400
20 mM EDTA	

**3.2.14. Photometrische DNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung**

DNA-Konzentrationen wurden durch Messung der Extinktion einer DNA-Probe bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  bestimmt. Meist wurden 1:100 Verdünnungen vermessen. Die Konzentration der

DNA ergibt sich danach wie folgt:

$$c_{DNA}[ng\cdot\mu L^{-1}] = E_{280} \times 100 \times 50 \text{ ng}\cdot\mu L^{-1}$$

Der in der Probe enthaltene Proteinanteil wurde durch Messung der Extinktion bei  $\lambda = 280 \text{ nm}$  bestimmt. Der Reinheitsgrad der Probe wurde durch den Quotienten  $E_{260}/E_{280}$  ermittelt.

### **3.2.15. DNA-Sequenzanalyse**

Die DNA-Sequenzierung nach dem Kettenabbruch- oder Didesoxynucleotidverfahren nach Sanger [Sanger, 1977] dient als analytische Methode zur Verifizierung rekombinant hergestellter Plasmide. Mit den Analysen aller Plasmidlösungen mit einer Konzentration von mindestens  $30 \text{ ng } \mu L^{-1}$  wurde die Firma GATC (Konstanz) beauftragt. Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend mit der Software *Megalign* auf Fehlerfreiheit kontrolliert.

### **3.2.16. Darstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen**

Elektrokompente Zellen wurden nach dem Protokoll von Dower [Dower, 1988] in leicht modifizierter Form hergestellt. Mit einer von einer frisch ausgestrichenen LB-Agar-Kultur (siehe Kapitel 2.5) gepickten Einzelkolonie wurde eine 50 mL Vorkultur in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  und 225 rpm geschüttelt. Mit dieser Starterkultur wurden 1000 mL vorgewärmtes LB-Medium mit Antibiotikum im Verhältnis 1:100 angeimpft und die Kultur bis zum Erreichen einer  $OD_{595}$  von 0.7-0.9 bei  $37^\circ\text{C}$  und 225 rpm geschüttelt. Danach wurde sie für 20 min auf Eis gestellt, um eine Verminderung der Transformationsrate zu vermeiden. Anschließend wurden die Zellen durch zehnminütige Zentrifugation mit 5000 rpm bei  $4^\circ\text{C}$  pelletiert. Die Resuspension des Pellets erfolgte in 450 mL eiskaltem, sterilem bidestillierten Wasser. Die Zellen wurden ein zweites Mal analog pelletiert und der Waschschrift nochmals wiederholt. Der Überstand wurde möglichst vollständig abgenommen und die Zellen danach in 450 mL eiskaltem 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Nach einer zweiten Zentrifugation erfolgte die Aufnahme des Pellets in 2.5 mL eiskaltem 10 % (v/v) Glycerin. Die entstandene Suspension wurde zu

50 µL in sterile Cryotubes aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die elektrokompenten Zellen konnten bis zur Verwendung für mehrere Monate bei -80 °C gelagert werden.

#### **3.2.17. Transformation elektrokompenter *E. coli*-Zellen**

Durch Elektroporation kann Plasmid-DNA mit Hilfe einer kurzen starken elektrischen Entladung in Zellen eingeführt werden (ca. 2.5 kV bei *E. coli*). Zellen, die während dieses Vorgangs ein Plasmid aufgenommen haben, werden im Anschluss durch ein oder mehrere auf dem Plasmid befindliche Resistenzgene von plasmidfreien Zellen auf antibiotikahaltigem Nährmedium separiert.

Ein tiefgefrorenes Aliquot elektrokompenter Zellen (50 µL) wurde auf Eis aufgetaut und etwa 100 ng Plasmid-DNA dazugegeben. Die Zellsuspension wurde in eine vorgekühlte Elektroporationskuvette (0.2 cm Spaltbreite) überführt und diese in einem Kuvettenhalter in die Elektroporationskammer geschoben. Die folgende Elektroporation mit dem Programm Ec2 (*E. coli*, 0.2 cm Spaltbreite) sollte für eine erfolgreiche Transformation eine Pulsdauer von mindestens 4.5 ms liefern. Die sofortige Zugabe von 1 mL vorgewärmtem LB-Medium ohne Selektionsmarker zum Transformationsansatz direkt nach dem Puls sollte die Regeneration der Zellen beschleunigen. Diese wurden im Anschluss mindestens 30 min bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt, bevor die Suspension auf einer Agarplatte mit adäquatem Antibiotikum ausgestrichen wurde.

Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, am nächsten Tag mit Parafilm abgedichtet und für maximal vier Wochen bei 4 °C gelagert.

#### **3.2.18. Darstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen**

Mit einer von einer frisch ausgestrichenen LB-Agar-Kultur (siehe Kapitel 2.5) gepickten Einzelkolonie wurde eine 50 mL Vorkultur in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt. 100 mL LB-Medium wurden im Verhältnis 1:100 mit 500 µL dieser Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 225 rpm bis zum Erreichen einer OD<sub>595</sub> von 0.5 bis 0.6 angezogen. Nach einer kurzen Abkühlung der Kultur in Eiswasser wurden die Zellen pelletiert (2500 rpm, 10 min,

4 °C) und das erhaltene Zellpellet in 30 mL TFB I-Puffer resuspendiert. Nach einer zweistündigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut pelletiert (2500 rpm, 5 min, 4 °C) und anschließend in TFB II-Puffer resuspendiert. Die entstandene Suspension wurde zu 50 µL in sterile Cryotubes aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die chemisch kompetenten Zellen konnten bis zur Verwendung für mehrere Monate bei -80 °C gelagert werden.

TFB I-Puffer	TFB II-Puffer
100 mM RbCl	10 mM MOPS
50 mM MnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	10 mM RbCl
30 mM KOAc	75 mM CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O
10 mM CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	15 % (v/v) Glycerin 87 %
15 % (v/v) Glycerin 87 %	
sterilfiltrieren	sterilfiltrieren

### 3.2.19. Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation werden Zellen eingesetzt, deren Membran durch die Behandlung mit bestimmten Salzen so modifiziert wurde, dass die Aufnahme von Plasmid-DNA in die Zelle ermöglicht wird. Hauptsächlich wird diese Methode der Transformation zur Retransformation genutzt. Für die Transformation von Ligationsansätzen ist sie aufgrund der schlechteren Transformationseffizienz gegenüber der Elektroporation weniger geeignet.

Ein tiefgefrorenes Aliquot chemisch kompetenter Zellen (50 µL) wurde auf Eis aufgetaut, etwa 200-300 ng Plasmid-DNA dazugegeben, durchmischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Transformation durch Erhitzen im Wasserbad (90 sec, 42 °C). Die Zellen wurden für 5 min auf Eis abgekühlt und anschließend mit 1 mL auf 37 °C vorgewärmtem glucosehaltigem SOC-Medium versetzt. Die Zellsuspension wurde nach abgeschlossener Regeneration (37 °C, 45-60 min, 225 rpm) auf LB-Agarplatten mit Selektionsmarker ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Abdichtung mit Parafilm und anschließende Lagerung für maximal vier Wochen bei 4 °C.

#### **3.2.20. Test- und Blindtransformation kompetenter Zellen**

Dieser Test wurde durchgeführt, um zu gewährleisten, dass die hergestellten kompetenten Zellen frei von Verunreinigungen sind und sie außerdem über eine genügend hohe Transformationseffizienz verfügen.

Dazu wurde eine definierte Menge eines bekannten Plasmids transformiert, von der Zellsuspension mehrere Verdünnungen auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmarker ausplattiert und die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Die Reinheit der Zellen wurde mittels Transformation ohne DNA kontrolliert, die bei einwandfreier Zellpräparation keine Transformanten lieferte.

#### **3.2.21. Stammhaltung und Wachstum**

Die verwendeten Bakterienkulturen wurden für kurze Zeit auf Agarplatten im Kühlschrank bei +4 °C aufbewahrt. Zur Dauerlagerung bei -80 °C wurden DMSO- und Glycerinstocks angelegt, für deren Herstellung Übernachtskulturen der Bakterien verwendet wurden. Diese wurden mit 10 % DMSO bzw. im Verhältnis 1:2 mit Glycerin (87 % v/v) versetzt und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Von den so angelegten Vorräten wurden bei Bedarf alle vier Wochen erneut Kulturen auf Agarplatten angezogen.

Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben im Schüttelinkubator bei einer Temperatur von 37 °C angezogen. Volumina bis 100 mL wurden mit Einzelkolonien angeimpft, größere Volumina mit Übernachtskulturen im Verhältnis 1:50.

#### **3.2.22. Herstellung T $\diamond$ T-haltiger DNA**

Benötigte Thymin-Thymin-Dimer-haltige DNA wurde im Arbeitskreis Prof. Batschauer (Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg) durch Bestrahlung von Lachssperma-DNA (Fluka) mit einer UV-B Quelle (TL40/W12, *Philips*) hergestellt. 10 mL Lachssperma-DNA (1 mg·mL<sup>-1</sup> in H<sub>2</sub>O) wurde nach Ultraschallbehandlung zweifach mit je 10 mL Phenol/Chloroform und danach einmal mit 10 mL Chloroform extrahiert, um etwaige Proteinreste von der Probe zu entfernen. Anschließend erfolgte das Aussalzen der DNA mit 1 mL NaCl (4 M) und deren Fällung mit 2,5-fachem Überschuss Ethanol. Das erhaltene Pellet



wurde vorsichtig mit 70 % Ethanol gewaschen, zentrifugiert (13000 rpm, 5 min, RT), getrocknet (30 min, 37 °C) und danach in 10 mL dest. H<sub>2</sub>O gelöst. Die erhaltene DNA-Lösung wurde in eine silanisierte Glaspetrischale (Ø = 10 cm) überführt, diese mit einem 3 mm Kantenabsorptionsfilter (WG 295 nm, *Schott*) abgedeckt und abgedichtet. Für die nächsten 24 h wurde nun unter leichtem Schütteln (50 rpm) mit UV-B-Licht in 10 cm Abstand bestrahlt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der DNA-Konzentration bei 260 nm und die Verdünnung mit H<sub>2</sub>O auf 0.05 mg·mL<sup>-1</sup>. Die so erhaltene T $\phi$ T-haltige DNA-Lösung wurde aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 3.3. Proteinchemische Methoden

Die folgenden Standardtechniken wurden im Wesentlichen nach Sambrook *et al.* [Sambrook, 2000] durchgeführt: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli [Laemmli, 1970], Coomassie-Blue Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen nach Bennett & Scott [Bennett, 1971] und Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford [Bradford, 1976].

#### 3.3.1. Heterologe Genexpression in *E. coli*

Von einer Agarplatte wurde zunächst eine Einzelkolonie mit *E. coli* BL21CodonPlus<sup>®</sup>(DE3)-RIL und dem das gewünschte Gen tragenden Expressionsvektor gepickt, eine Starterkultur in TB/Kan<sup>35</sup>/Cam<sup>50</sup> angeimpft und diese über Nacht geschüttelt (37 °C, 225 rpm). Von dieser Starterkultur wurde die Hauptkultur in dem gleichen, vorgewärmten Medium 1:25 oder 1:50 angeimpft und nach der Methode der Autoinduktion [Grossman, 1998; Kelley, 1995] ohne den Zusatz von IPTG angezogen (20 h, 37 °C, 225 rpm). Nach dem Zellwachstum wurde die Kultur auf Eis gekühlt und ihre optische Dichte bestimmt. Eine Probe (1 mL) für die Kontrolle der Expression mittels SDS-PAGE wurde ebenfalls genommen.

Die bakterienhaltigen Flüssigkulturen wurden schließlich abzentrifugiert (8000 rpm, 20 min, 4 °C) und das daraus erhaltene Pellet in 10 mL AM-Puffer pro Liter Kulturmedium resuspendiert.

War keine sofortige Weiterverarbeitung notwendig, führte langsames Eintropfen der

Zellsuspension in flüssigen Stickstoff zu gefrorenem Bakteriengranulat, das über ein Papiertuch abfiltriert und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert werden konnte.

AM-Puffer	
20 mM	Tris-HCl, pH 8.0
200 mM	NaCl

#### 3.3.2. Präparation von *E. coli* Rohzelleextrakten

Die Freisetzung der Proteine aus der mit 0.2 µg PMSF pro Gramm versetzten Suspension erfolgte über einen Aufschluss mittels Frenchpress (*SLS Aminco*) oder Fluidizer (*Avestin*). In einer Kammer wurde die Zellsuspension dabei einem hohen Druck von etwa 1500 psi ausgesetzt. Durch den plötzlich auftretenden Druckabfall beim tropfenweisen Austreten der Suspension durch ein Ventil mit niedrigem Querschnitt kommt es zum Zerreißen der Zellwände sowie der Zellmembranen und Freisetzung aller intrazellulären Bestandteile. Um einen möglichst quantitativen Zellaufschluss zu gewährleisten, wurden drei Kompressions- und Dekompressionszyklen durchlaufen. Mit dem Durchführen der gesamten Behandlung bei 4 °C sollten die rekombinanten Proteine geschont werden. Eine Zentrifugation (8000 rpm, 25 min, 4 °C) des Rohlysats trennte lösliche von unlöslichen Komponenten. Der erhaltene lösliche Überstand wurde im Folgenden für die Proteinaufreinigung eingesetzt.

#### 3.3.3. Hitzedenaturierung

Eine überaus effiziente Methode zur Aufreinigung rekombinanter thermophiler Proteine ist die Hitzefällung, da nahezu alle mesophilen Proteine des Expressionswirtes *E. coli* bei Temperaturen von deutlich höher als 45 °C denaturieren, während thermophile Proteine in Lösung verbleiben und durch Zentrifugation problemlos abgetrennt werden können.

Das Zellysat aus French-Press-Aufschluss wird im Wasserbad bei 65 °C für 15 min inkubiert. Denaturierte Proteine werden im Anschluss durch Zentrifugieren (8000 rpm, 20 min, 4 °C) vom Überstand abgetrennt und mit dem Volumen des eingesetzten Zellysats in AM-Puffer

resuspendiert. Sich anschließende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit allen Proben dient der Kontrolle der Vollständigkeit und der Effizienz der Hitzedenaturierung.

### 3.3.4. Affinitätschromatographie

Für die weitere Reinigung der DNA-Photolyase wurde eine Farbstoff-Affinitätschromatographie durchgeführt. Bei dieser Methode wird die Affinität von Farbstoffen für bestimmte Proteinbereiche genutzt, die zumeist für die Bindung von heterozyklushaltigen Cofaktoren wie ATP, NADH, NADPH oder FAD verantwortlich sind. Bestehende Interaktionen von dem an Säulenmaterial gebundenen Farbstoff mit dem Protein nehmen mit steigender Salzkonzentration ab, wodurch dessen Elution durch Anlegen eines steigenden Salzgradienten erreicht werden kann.

Als Säulenmaterial wurde Blue Sepharose CL-6B (Säulenvolumen: 18.1 mL) in einem XK16 Säulenkörper (*Pharmacia*, Freiburg) verwendet. Nach Auftrag des Proteingemischs aus der vorangegangenen Hitzefällung (siehe Kapitel 3.3.3) wurde mit etwa drei Säulenvolumina Waschpuffer bis zum Erreichen einer stabilen Basislinie bei  $\lambda = 280$  nm gewaschen und im Anschluss das gereinigte Protein durch einen linear ansteigenden Salzgradienten von 0.1 bis 2.0 M KCl (50 min) eluiert. Danach erfolgte die weitere Elution mit 2.0 M Salz, bis keine Proteinabsorption mehr vorhanden war. Für die gesamte Chromatographie wurde eine Flussrate von  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  gewählt. Fraktionen wurden jeweils mit 1 mL Volumina gesammelt. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese diente zur Beurteilung und Konzentration des Proteingehalts der einzelnen Fraktionen, von denen photolyasehaltige vor der weiteren Aufreinigung gepoolt wurden.

Auftragspuffer	Waschpuffer
50 mM HEPES, pH 7.0	50 mM HEPES, pH 7.0
10 mM $\beta$ -Mercaptoethanol	10 mM $\beta$ -Mercaptoethanol
50 mM NaCl	100 mM KCl
10 % (v/v) Glycerin	10 % (v/v) Glycerin
0.01 % (w/v) $\text{NaN}_3$	0.01 % (w/v) $\text{NaN}_3$

Elutionspuffer	
50 mM	HEPES, pH 7.0
10 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol
2.0 M	KCl
10 % (v/v)	Glycerin
0.01 % (w/v)	NaN <sub>3</sub>

#### 3.3.5. Entsalzung und Umpufferung

Für einige der durchgeführten Experimente war eine Umpufferung bzw. Entsalzung von Proteinen notwendig, um die Pufferbedingungen den Erfordernissen anzupassen. Das Prinzip gleicht dem einer Gelfiltration. Hochmolekulare Substanzen werden, da sie wesentlich größer als das Ausschlussvolumen des Säulenmaterials Sephadex G-25 M sind, zuerst eluiert. Niedermolekulare Substanzen (z.B. Salze, Cofaktoren) werden durch ihre spätere Elution vom Protein abgetrennt. Zum Einsatz kamen gebrauchsfertig gepackte PD-10 und HiTrap Desalting Säulen (*Amersham*).

#### 3.3.6. Ultrafiltration

Die Ultrafiltration dient der Konzentrierung von Proteinen. Durch die Wahl von Konzentratoren mit geeigneter Porengröße kann das gewünschte Protein zurückgehalten werden, niedermolekulare Substanzen, kleinere Proteine und Wasser aber können ungehindert die Membran passieren.

Im Verlauf der Ultrafiltration wird die Proteinkonzentration photometrisch durch die Methode nach Bradford (siehe Kapitel 3.3.8) verfolgt. Die Aufkonzentrierung der *Thermus thermophilus* DNA-Photolyase wurde spätestens bei einer Konzentration von 25 mg·mL<sup>-1</sup> beendet, da bei höheren Konzentrationen ansonsten die Aggregation des Proteins beobachtet werden kann. Verwendete Konzentratoren besaßen ein Ausschlussvolumen von 10 kDa.

Für kurzzeitspektroskopische Experimente waren insbesondere eine hohe Konzentration und eine hohe Langzeitstabilität von Bedeutung. Mit dem Zusatz von 30 % (v/v) Glycerin und

10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol zum Proteinpuffer konnten Konzentrationen von  $18.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $384 \text{ }\mu\text{M}$ ) für die native sowie  $23.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $484 \text{ }\mu\text{M}$ ) für die antennencofaktorfreie R46E-Mutante der *T. thermophilus* Photolyase erreicht werden., die die geforderte Stabilität aufwiesen

### 3.3.7. Gelfiltration

Bei einer Gelfiltration werden Proteine und andere Makromoleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe bzw. ihres Molekulargewichts in einer Gelmatrix aus feinporigen Polymerkügelchen aufgetrennt. Große Moleküle oberhalb der Ausschlussgröße der Matrix dringen nicht in die Säulenbeads ein und passieren nahezu ungehindert, während kleinere gemäß ihrer vom verwendeten Säulenmaterial bestimmten Diffusionsrate in die Matrix eindringen und daher ein größeres Volumen durchdringen müssen. Aufgrund der unterschiedlichen Diffusionsraten in der porösen Säulenmatrix eluieren sie dementsprechend später.

Die verwendete Sephacrylmatrix besteht aus einem Gemisch von mit N, N'-Methylenbisacrylamid kovalent quervernetztem Allyldextran. Es bildet eine hydrophile Matrix von hoher mechanischer Stabilität, deren Porosität durch die Dextran-Komponente bestimmt wird.

Für den letzten Reinigungsschritt der thermophilen DNA-Photolyase kam Sephacryl S200-HR (*Pharmacia*, Freiburg) zum Einsatz. Je nach anfallendem Probenvolumen wurde das zu reinigende Protein auf eine Säule mit einem Säulenvolumen von  $V_t = 58.5 \text{ mL}$  oder  $V_t = 206.8 \text{ mL}$  aufgetragen. Der eingesetzte Puffer bestand aus für die Stabilisierung und weitere Handhabung der Photolyase geeigneten Komponenten. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese diente zur Beurteilung von Reinheit und Konzentration des Proteingehalts proteinhaltiger Fraktionen, von denen geeignete gepoolt wurden.

---

#### Gelfiltrationspuffer

---

10 mM Tris-HCl, pH 8.0

100 mM NaCl

0.01 % (w/v)  $\text{NaN}_3$

---

#### 3.3.8. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die quantitative Proteinbestimmung nach Bradford [Bradford, 1976] wird unter Verwendung der Coomassie-Brilliant Blue G-250-Lösung der Firma *Biorad* durchgeführt. Mit der Bildung eines Farbstoff-Protein-Komplexes verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Lösung innerhalb einer Inkubationszeit von 5-10 Minuten bei Raumtemperatur von 465 nm nach 595 nm durch eine Interaktion des Farbstoffes mit dem Protein an unpolaren Resten und vorzugsweise Argininen.

Es wurden 200 µL Bradfordlösung und 800 µL entionisiertes Wasser in einer Einmalküvette vorgelegt. Von der zu untersuchenden Proteinlösung wurden zwischen 0.5 µL und 10 µL hinzugefügt und kräftig mit dem Reagenz vermischt. Die Größe der Absorptionsverschiebung ist proportional abhängig von der Proteinkonzentration und ermöglicht damit eine relativ genaue Bestimmung. Eine mit BSA-Lösungen bekannter Konzentrationen (1-20 µg) hergestellte Eichgerade diente als Referenz.

#### 3.3.9. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli dient zur quantitativen Proteinanalyse und zur Reinheitskontrolle der gereinigten Proteine [Laemmli, 1970]. Das verwendete Caster-System *Mighty Small II* (*Hoefer Scientific*) ermöglicht das gleichzeitige Gießen von bis zu zehn Gelen mit identischer Zusammensetzung.

Zu untersuchende Proteinproben wurden vor Auftrag auf ein Gel mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C im Wasserbad denaturiert.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstanten 20 mA pro Gel. Für die Zuordnung eines Molekulargewichts der zu beobachtenden Banden im Proteingel wurde stets ein Größenstandard mit aufgetragen. Zur Verwendung kam hier durchweg der Proteinmarker peqGOLD Protein-Marker I (*peqlab*) mit distinkten Banden zwischen 14.4 kDa und 116.0 kDa.

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde das Gel in Färbelösung für mindestens 30 Minuten gefärbt und danach in Entfärbelösung innerhalb von 1-2 Stunden entfärbt, bis die Proteine sichtbar wurden.

**3x Trenngelpuffer**

1.125 M Tris-HCl, pH 8.0  
30 % (w/v) Saccharose

**5x Sammelgelpuffer**

0.625 M Tris-HCl, pH 6.8

**Laufpuffer**

0.25 M Tris-Base  
2 M Glycin  
1 % (w/v) SDS

**Probenpuffer**

62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8  
15 % (w/v) Glycerin  
4 % (v/v) SDS  
0.001 % Bromphenolblau  
4 %  $\beta$ -Mercaptoethanol

**Trenngel 12 %, 60 mL**

24 mL Acrylamid (30 % mit 0.8 % Bisacrylamid)  
15.18 mL H<sub>2</sub>O  
600  $\mu$ L SDS 10 %  
20 mL 3x Trenngelpuffer  
60  $\mu$ L TEMED  
300  $\mu$ L APS 10 % (w/v)

**Sammelgel 4 %, 50 mL**

6.65 mL Acrylamid (30 % mit 0.8 % Bisacrylamid)  
32.85 mL H<sub>2</sub>O  
500  $\mu$ L SDS 10 %  
10 mL 5x Sammelgelpuffer  
50  $\mu$ L TEMED  
500  $\mu$ L APS 10 % (w/v)

**Färbe-Lösung**

0.25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250  
5 % (v/v) Essigsäure  
50 % (v/v) Ethanol

1 Stunde rühren, anschließend filtrieren

**Entfärber-Lösung**

5 % (v/v) Essigsäure  
28 % (v/v) Isopropanol

**3.3.10. ELISA**

Das immunologische Nachweisverfahren *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) beruht auf einer enzymatischen Farbreaktion, mit der Stoffe wie z.B. Proteine, Viren oder auch niedermolekulare Substanzen wie DNA nachgewiesen werden können. Ein für den nachzuweisenden Stoff spezifischer Antikörper wird an eine spezielle Mikrotiterplatte gebunden und mit dem nachzuweisenden Antigen inkubiert. Ungebundene Bestandteile werden abgewaschen und das an den Antikörper gebundene Antigen mit dem Detektionsantikörper versetzt. Durch dessen Bindung entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex, in dem das Antigen sandwichartig zwischen den beiden Antikörpern gebunden ist. Überschüssiger sekundärer Antikörper wird durch wiederholtes Waschen der Platte entfernt. Durch seine Konjugation mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) wird durch die Zugabe von OPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (*o*-Phenyldiamin) eine Farbreaktion ausgelöst, die mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt werden kann. Die Intensität der entstandenen gelb-orangen Färbung ist dabei proportional zu der Konzentration des zu bestimmenden Antigens und wird durch Auslesen der Mikrotiterplatten in einem ELISA-Plattenleser ( $\lambda_{\text{max}} = 490 \text{ nm}$ ) bestimmt.

Reaktionspuffer	
10 mM	NaPO <sub>4</sub> , pH 7.5
150 mM	NaCl
10 mM	DTT
1 mg·mL <sup>-1</sup>	Glukoseoxidase
0.1 mg·mL <sup>-1</sup>	Katalase
10 mM	Glukose

PBS-T Puffer	
10 mM	NaPO <sub>4</sub> , pH 7.4
150 mM	NaCl
0.05 % (w/v)	Tween 20

PBS-Puffer	
10 mM	NaPO <sub>4</sub> , pH 7.4
150 mM	NaCl



Citrat-Phosphat-Puffer	ODP-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung
24 mM Na-citrat	Citrat-Phosphat-Puffer mit
mit 50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> auf	0.4 % (w/v) o-Phenyldiamin (ODP)
pH 5.0 einstellen	0.007 % (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

### 3.3.11. Kapillarelektrophorese

Die verwendete, innen mit Polyacrylamid beschichtete Kapillare hatte eine Länge von 20 cm bis zum Detektionsfenster. Als stationäre Phase diente ein sechsprozentiges lineares Polyacrylamidgel in Verwendung mit einem 100 mM Tris-Borat (pH 8.4) und 2 mM EDTA enthaltenden Puffer. Als weiteren Bestandteil enthielt der Puffer 7 M Harnstoff zur Sicherstellung der DNA-Denaturierung. Die Auftragung der DNA-Proben erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 10 kV während einer Injektionsdauer von 4 sec. Die Auftrennung wurde innerhalb von 45 min bei 9 kV durchlaufen.

### 3.4. Proteinkristallisation und Strukturbestimmung

Alle Kristallisationsexperimente mit der nativen DNA-Photolyase und mutierten R46E-Variante aus *Thermus thermophilus* und dem Cryptochrom 3 aus *Arabidopsis thaliana*, ausgenommen der Cokristallisationsansätze, wurden in einem auf konstante 19 °C temperierten Raum durchgeführt. Die Durchführung der verschiedenen Cokristallisationsexperimente mit T $\phi$ T-Dimer-Schaden enthaltenden Oligomeren erfolgte ausschließlich unter Rotlichtbedingungen in einem auf 8 °C klimatisierten, abgedunkelten Raum.

Die erste Kontrolle der Kristallisationsansätze fand zunächst direkt im Anschluss ihrer Erstellung statt. Im Folgenden erfolgten die Beobachtungen nach wenigen Tagen, weitere Protokollierung bei bis dahin nicht erfolgter Kristallisation regelmäßig nach einer Woche. Nach sechs bis acht Wochen wurde der Beobachtungszeitraum auf eine vierwöchige Kontrolle der Ansätze verlängert.

Bei den im Allgemeinen unbekannten möglichen Kristallisationsbedingungen wurden zuerst

immer mehrere Sparse Matrix Screens (*Hampton Research*: Crystal Screen, Crystal Screen Lite; *Sigma*: Basic Screen, Extension Screen, Cryo Screen; *Nextal*: Classic Suite, Classic Lite Suite, Anion Suite) auspipettiert [Jancarik, 1991]. Diese werden prinzipiell für ein erstes Screening angewandt, um eine oder mehrere passende Kristallisationsbedingungen zu finden. Zusammengefasst sind in diesen Screens ausgewählte Parameter von bekannten oder veröffentlichten erfolgreichen Kristallisationsbedingungen. Somit kann schon mit einer relativ geringen Proteinmenge ein großer Bereich von Erfolg versprechenden Konditionen abgedeckt werden. Nach Auffinden einer oder mehrerer geeigneter Kristallisationsbedingungen unter diesen ersten Screens wurden diese in einem sich anschließenden Raster-Screen durch Variation von Salz- und Fällungsmittelkonzentrationen sowie des pH-Wertes systematisch bis zur Ermittlung einer idealen Bedingung verfeinert, bei der regelmäßige und ausreichend große Kristalle für die Röntgendiffraktion erhalten werden konnten.

Zu den gebräuchlichsten Methoden der Proteinkristallisation zählen die folgenden: *hanging drop*, *sitting drop*, Kristallisation unter Öl, Kristallisation in einer Kapillare und Mikrodialyse.

#### **3.4.1. *hanging drop*-Kristallisation**

Vorteilhaft an dieser Kristallisationsmethode ist der Ausschluss von Wechselwirkungen eines entstandenen Proteinkristalls mit der Oberfläche des Reservoirdeckels, da der Kristall nach unten sinkt. Da die Partialdrücke des Wassers in Reservoir und Tropfen unterschiedlich sind, verdunstet im Tropfen Wasser bis zum Erreichen eines Gleichgewichts zwischen Reservoir und Tropfen. Die durch den Wasserentzug erhöhten Protein- und Fällungsmittelkonzentrationen können zu unterschiedlichen Effekten führen. Durch den Einsalz- beziehungsweise Aussalzeffekt kann die Löslichkeit des Proteins erhöht oder verringert werden. Oft kann auch ein durch höhere Fällungsmittelkonzentration verursachtes ungeordnetes Präzipitieren des Proteins beobachtet werden. Im Idealfall kommt es jedoch zur Nukleation des Proteins und zu anschließendem Kristallwachstum.

Diese am häufigsten angewandte Methode der Dampfdiffusion [Davies, 1971] beim manuellen Pipettieren von Kristallisationsansätzen wurde fast durchweg im 6x4 Format mit VDX-Platten (*Hampton Research*) ausgeführt. Ein Tropfen mit gleichen Volumina Proteinprobe und Fällungsreagens wurde auf einem silikonisierten Deckglas mit 22 mm Durchmesser hängend und durch einen Ring Silikonfett luftdicht verschlossen, über einem Reservoir, das 750 µL Fällungsreagens enthält, positioniert. Stets beginnend mit dem

Pipettieren des Proteins, erfolgte die Zugabe und homogene Vermischung durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit dem Fällungsreagens im Anschluss. Alternativ kamen verschraubbare EasyXtal Tool-Platten (*Qiagen*) zum Einsatz.

#### **3.4.2. *sitting drop*-Kristallisation**

Die *sitting drop*-Variante der Dampfphasendiffusion kommt hauptsächlich bei der Verwendung von Kristallisationsrobotern zum Einsatz. Hier erfolgt die Mischung von Protein mit Fällungsmittel in einer oder mehrerer neben dem Reservoir liegenden Vertiefungen. Die gesamte, 96 einzelne Kristallisationsbedingungen fassende Crystalquick Plus-Platte (*Greiner Bio-one*) wird im Anschluss an den Pipettiervorgang luftdicht mit einer selbstklebenden, transparenten Folie abgedichtet. Das Prinzip ist mit dem der *hanging drop*-Methode identisch.

#### **3.4.3. *soaking*-Experimente**

Durch große Solvenskanäle und Abstände im Kristallgitter von Proteinkristallen können verschiedene kleinere Moleküle wie etwa Cofaktoren durch ihre Zugabe zur Präzipitanzlösung in die Struktur eines bereits bestehenden Proteinkristalls eingebaut werden. Bleiben bei einem erfolgten Einbau die verschiedenen Kristallparameter (z.B. Abmessungen der Einheitszelle, Winkel und Raumgruppe) nahezu unverändert und löst sich der Kristall nicht auf, so können mit diesem *gesoakten* Kristall röntgenstrukturanalytische Untersuchungen durchgeführt werden.

Für die hier ausgeführten *soaking*-Experimente wurden aus einem vorangegangenen *hanging drop*-Experiment hervorgegangene Bedingungen mit einem oder mehreren nativen Kristallen verwendet. Nach Zugabe einer bestimmten Menge des entsprechenden Cofaktors direkt zum Kristallisationstropfen erfolgte das *soaking* im Zeitraum von einer bis zu mehreren Stunden (siehe Kapitel 4.4.7).

#### 3.4.4. *seeding*-Experimente

Voraussetzung für dieses Experiment sind in der Regel Kristalle des entsprechenden Proteins, die bereits durch andere Kristallisationsmethoden erhalten wurden. Durch *seeding* können Kristalle in der metastabilen Zone wachsen, lassen sich gut reproduzieren und es findet keine spontane Nukleation statt. Für das Verfahren werden je nach Größe einer oder wenige Kristalle in 50 µL einer durch höheren Salzgehalt oder Zugabe von 20 % Glycerin stabilisierten Lösung des Kristallisationspuffers in einen *seed bead* (Hampton Research) überführt. Anschließendes einminütiges Vortexieren generiert die Kristallfragmente, mit denen hinterher eine Verdünnungsreihe (1:2, 1:5, 1:10) pipettiert wird, um die Anzahl der in den Tropfen einzubringenden *seeds* modifiziert wird und sich die Fülle der wachsenden Kristalle beeinflussen lässt [Stura, 1992]. Unter Zuhilfenahme eines Katzenhaares werden die Mikrokristalle in den hergestellten Lösungen in Form eines Kreuzes in einen neuen Kristallisationsansatz eingebracht.

Diese Technik fand in der vorliegenden Arbeit zur Kristallisation der R46E-Mutante der CPD-Photolyase aus *Thermus thermophilus* Anwendung.

#### 3.4.5. Cokristallisation

Das Ziel dieser Kristallisationsmethode ist es, bereits während der Kristallisation des Proteins bestimmte Substrate direkt in die Kristallstruktur einzubauen. Die Cokristallisation wird nach Wahl mit einer der oben beschriebenen Methoden (siehe Kapitel 3.4.1-3.4.4) kombiniert. Zusätzlich zur Proteinlösung und dem Fällungsreagens ist dem Tropfen eine dem Protein angepasste Menge des Substrats zugegeben. Da davon auszugehen ist, dass sich wesentliche Faktoren wie Zellparameter und Raumgruppe der Kristalle bei gebundenem Substrat im Vergleich zum reinen Proteinkristall maßgeblich ändern werden, ist diese Technik der Kristallisation die erfolgversprechendere Variante. Mit der sich anschließenden Strukturuntersuchung durch Röntgenbeugung sollte es so möglich sein, unter anderem Aussagen über die Wechselwirkungen mit dem Protein und daraus folgend eventuell über den Reaktionsmechanismus der katalysierten Reaktion des Enzyms abzuleiten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Cokristallisationsexperimente mit der Photolyase aus *Anacystis nidulans*, Cryptochrom 3 aus *Arabidopsis thaliana* und verschiedenen CPD-haltigen Substraten durchgeführt. Als zugrunde liegendes Verfahren diente die *hanging*

*drop* Dampfdiffusions-Kristallisation.

#### **3.4.6. Austesten von Cryo-Bedingungen**

Für die Datensammlung durch Röntgendiffraktion müssen die Kristalle in einem kontinuierlichen Stickstoffstrom auf eine Temperatur von 100 K gekühlt werden. Dies dient zur Minimierung von Strahlenschäden durch die eingesetzte Röntgenstrahlung und verhindert das Austrocknen der empfindlichen Kristalle. Dabei darf die den Kristall umgebende Flüssigkeit keine Eiskristalle ausbilden, die die Messung durch das Auftreten charakteristischer Pulverringe ( $1.9 \text{ \AA}$ ,  $2.5 \text{ \AA}$ ,  $3.66 \text{ \AA}$ ) im Beugungsbild empfindlich stören würden.

Im Idealfall kann die Wachstumslösung ebenfalls als Cryopuffer dienen, wenn beispielsweise entsprechende Stoffe wie Glycerin oder Polyethylenglycole in genügendem Ausmaß vorhanden sind. Ist dies nicht der Fall, führt etwa der Zusatz von Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 35 % (v/v) meist zum gewünschten Ziel. Als Variation zu Glycerin können unter anderem auch verschiedene Zucker oder längerkettige Polyethylenglycole (z.B. PEG 400) eingesetzt werden. Üblicherweise ist ein Eintauchen des Kristalls für die Dauer von 20-30 Sekunden in den Cryopuffer ausreichend. Zeigt ein Kristall bei einer gefundenen Cryobedingung keine morphologischen Veränderungen, kann mit der Messung des im Anschluss in eine Cryoschleife (*Hampton Research*) eingebrachten Kristalls begonnen werden.

#### **3.4.7. Datensammlung und Datenreduktion**

Der in einer Cryoschleife tiefgefrorene Kristall wird auf dem im Kühlstrom des Cryostats liegenden Goniometerkopf im Röntgenstrahl zentriert und während der Belichtungszeit um einen bestimmten Drehwinkel von  $0.2\text{-}0.5^\circ$  auf einer Drehanode (Bruker/Nonius AXS FR591, 50 kV, 80 mA) mit einer MAR345dtb Bildplatte (*MAR Research*) vermessen. Hochauflösende Datensätze konnten an den Synchrotronquellen des EMBL Hamburg (*beamlines*: BW7A, X11, X13) und am Paul-Scherrer-Institut an der Swiss Light Source in Villigen (Schweiz) (*beamline*: X06SA) aufgenommen werden.

Aus den erhaltenen Reflexen weniger Diffraktionsbilder wurden die Zellparameter,

Raumgruppe und die zu erwartende Auflösung bestimmt sowie die Integration der Reflexintensitäten mit dem Programm MOSFLM V6.1 [CCP4, 1994] durchgeführt. Die Option STRATEGY lieferte, nach Indizierung und Abschätzung der Mosaizität, einen für die Messung eines möglichst vollständigen Datensatzes erforderlichen Winkelbereich. Zur Beurteilung der Qualität eines Datensatzes wird durch Vergleich symmetrieäquivalenter Reflexe der sogenannte  $R_{\text{sym}}$ -Wert (*reliability index*) berechnet.

Die Skalierung der Intensitäten der Einzelbilder und die Datenreduktion zu Strukturfaktoramplituden erfolgten mit den Programmen SCALA und TRUNCATE [CCP4, 1994].

#### 3.4.8. Modellbau und Strukturverfeinerung

Die Lösung des Phasenproblems wurde durch Anwendung von Molekularem Ersatz (*molecular replacement*) mit dem Programm MOLREP [Vagin, 1997] auf die röntgenkristallographisch gewonnenen Daten erreicht. Dafür ist es notwendig, über ein bekanntes Strukturmodell zu verfügen, das eine grosse Ähnlichkeit mit der zu untersuchenden Struktur aufweist. Die Phasenberechnung erfolgt dann über eine inverse Fourier-Transformation aus dem Modell und ist üblicherweise ausreichend, um die bestehenden Abweichungen zu modellieren. Die kristallographische Verfeinerung des Startmodells erfolgte durch Molekulardynamikverfeinerung mit den Programmen Refmac5 [Murshudov, 1997] oder CNS [Brünger, 1998]. Die Verfeinerung der Atompositionen (*minimize*) und B-Faktoren (*bindividual*) in CNS wurde unter Einbeziehung der Parameter von Huber & Engh durchgeführt [Engh, 1991]. Bei der Strukturverfeinerung werden stereochemische Randbedingungen (z.B. Bindungslängen, Torsionswinkel und häufige Rotamere) berücksichtigt, um eine möglichst hohe Übereinstimmung zwischen dem gemessenen Experiment und dem berechneten Strukturmodell zu erreichen. Ein zyklischer Verlauf des Prozesses wird so lange durchgeführt, bis keine weitere Optimierung des Modells mehr möglich ist.

Der manuelle Einbau des Modells in die  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ - und die  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ -Elektronendichten erfolgte mit den Programmen O [Jones, 1991] und Coot [Emsley, 2004]. Nach Verfeinerung der Proteinketten und gebundener Cofaktoren erfolgte in allen Fällen das Einpassen von Wassermolekülen in die Differenzelektronendichte. Die qualitative Beurteilung des erhaltenen optimierten Strukturmodells bezieht mehrere statistische Faktoren, wie etwa den kristallographischen R-Faktor, mit ein. Dieser sollte bei guter Übereinstimmung von

gemessenen Daten ( $F_{\text{obs}}$ ) mit dem berechneten Modell ( $F_{\text{calc}}$ ) in einer gut verfeinerten Struktur kleiner als 20 % sein. Die Einführung des freien R-Faktors  $R_{\text{free}}$  stellt ein deutlich besseres Konvergenzmerkmal dar [Brünger, 1992]. Unter Beachtung von Reflexen mit ähnlichen Beugungswinkeln wird eine zufällige Auswahl von 5-10 % der Daten als Testdatensatz definiert, der nicht in die eigentliche Verfeinerung mit einbezogen wird [Kleywegt, 1995]. Der erhaltene Wert ermöglicht es als empfindliches Gütekriterium, eine „Überfittung“ der Struktur wirkungsvoll zu verhindern.

#### **3.4.9. Suche nach Sequenz- und Strukturhomologen**

Der Vergleich der Strukturen mit in der RCSB-Proteindatenbank (<http://rcsb.org>) veröffentlichten bekannten Strukturen [Berman, 2000] wurde mit dem DALI-Server [Holm, 1993] des European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/dali/>) durchgeführt. Für die Suche nach sequenzhomologen Proteinen wurde der BLAST-Server des National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) in Anspruch genommen.

#### **3.4.10. Graphische Darstellungen**

Die Oberfläche der Proteine sowie die Oberflächenpotentiale wurden mit dem Programm APBS 0.5.0 [Baker, 2001] berechnet. Abbildungen der Proteinstrukturen und der Oberflächen wurden mit dem Programm Pymol 0.99 [Delano, 2002] erstellt. Für die schematischen Formeldarstellungen kam das Programm IsisDraw 2.5 [MDL Information Systems, 2002] zum Einsatz.

## 4. Resultate

<i>Protein</i>	<i>Organismus</i>	<i>Auflösung Å</i>	<i>Bemerkungen</i>	<i>PDB code</i>
DNA-Photolyase	<i>Thermus thermophilus</i>	19.9-2.0	Komplex mit FMN Antennenpigment	<a href="#">2J09</a>
DNA-Photolyase	<i>Thermus thermophilus</i>	18.9-1.95	Komplex mit 8-HDF Antennenpigment	<a href="#">2J07</a>
DNA-Photolyase	<i>Thermus thermophilus</i>	24.2-2.6	Komplex mit 8-IRF Antennenpigment	<a href="#">2J08</a>
DNA-Photolyase	<i>Anacystis nidulans</i>	30.0-1.80	Komplex mit CPD-haltiger dsDNA und 8-HDF	<a href="#">1TEZ</a>
Cryptochrom 3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	20.0-1.9	Komplex mit MTHF Antennenpigment	<a href="#">2J4D</a>
Cryptochrom 3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	15.0-2.0	Komplex mit CPD-haltiger ssDNA und MTHF	n.a.

**Tabelle 4.1:** In dieser Arbeit röntgenkristallographisch untersuchte DNA Photolyasen und Cryptochrome

### 4.1. Cokristallisation von *A. nidulans* Photolyase mit Thymindimer

#### enthaltender DNA

Das für die Cokristallisation der Klasse I Photolyase aus *Anacystis nidulans* verwendete, nach rekombinanter Überexpression in *E. coli* aufgereinigte Protein wurde nach Rekonstitution mit dem chemisch synthetisierten Antennenpigment 8-Hydroxy-7,8-didemethyl-5-deazariboflavin (8-HDF) von André P. M. Eker (Erasmus Universität, Rotterdam, Niederlande) bereitgestellt [Miki, 1993].

CPD-haltige DNA-Substrate wurden von Alexandra Mees (Arbeitskreis Prof. Dr. Thomas Carell, Fachbereich Chemie und Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München) synthetisiert und zur Verfügung gestellt [Mees, 2005].

Kristallisationsexperimente wurden in Zusammenarbeit mit Petra Gnau (Arbeitskreis Prof. Dr. Lars-Oliver Essen, Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg) nach dem *hanging drop*-Verfahren durchgeführt.



#### 4.1.1. Proteinvorbereitung und Bindungsansatz

Die aufgereinigte Photolyase aus *Anacystis nidulans* wurde zunächst von im Lagerungspuffer enthaltenen Glycerin durch Gelfiltration über eine PD10-Säule befreit.

Für die Cokristallisation kam ein synthetisch hergestelltes 14mer Oligonukleotid mit zentral positioniertem Analog eines *cis-syn*-Thymin-Thymin-Dimer-Schadens zum Einsatz, der über ein nicht hydrolisierbares Formacetal verknüpft war. Dieser zeigt die gleiche Stereochemie wie der natürliche Schaden und kann ebenso effektiv von CPD-Photolyasen repariert werden [Butenandt, 2000].

<b>CPD-Oligonukleotid</b>	5' – ATC GGC T=TC GCG CA – 3'
<b>Gegenstrang</b>	3' – AG CCG A AG CGC GTT – 5'

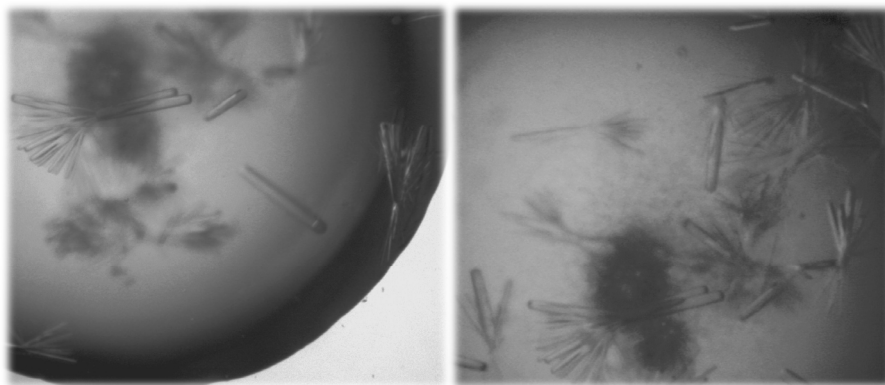
**Tabelle 4.2:** Für die Cokristallisation mit *A. nidulans* Photolyase eingesetztes 14mer Oligonukleotid mit CPD-Schaden und Gegenstrang.

Die Bindung des CPD-haltigen DNA-Doppelstrangs an das in einem semireduzierten Zustand (FADH<sup>•</sup>) befindliche Protein erfolgte in einem über die errechneten Verhältnis von 1:1.1 unter Rotlichtbedingungen über einen Zeitraum von 24 h bei 8 °C. Als Berechnungsgrundlage für die DNA-Konzentration wurde für das Thymin-Thymin-Dimer der Extinktionskoeffizient für zwei einzelne Thymine bei 260 nm verwendet, da für ein CPD keine Daten existieren. Im Anschluss wurde der Bindungsansatz, bis zum Erreichen einer Proteinkonzentration von 18 mg·mL<sup>-1</sup>, durch Ultrafiltration konzentriert und partikelfrei filtriert.

#### 4.1.2. Kristallisation

Sämtliche Kristallisationsexperimente, in Verbindung mit *A. nidulans* CPD-Photolyase und deren Substrat, wurden bei 8 °C unter strikten Rotlichtbedingungen durchgeführt, um sicherzustellen, dass eine lichtinduzierte DNA-Reparatur verhindert wird. Diese Handhabung schließt ausdrücklich die Inkubation und wiederkehrende Beobachtungen der Kristallisationsbedingungen sowie *cryo soaking* und das Wegfrieren der Kristalle mit ein. Zunächst ausgeführte Kristallisationsscreens (*Hampton* Crystal Screen, *Hampton* Crystal Screen Lite) erfolgten nach der gängigen *hanging-drop* Methode (siehe Kapitel 3.4.1) mit

Tropfenvolumina von 1  $\mu\text{L}$  Bindungsansatz und 1  $\mu\text{L}$  Reservoirlösung sowie einem Reservoirvolumen von 750  $\mu\text{L}$ . Nach sechs Monaten zeigten sich erste kleinere, kristallin verwachsene Objekte in einer 1:1 mit bidestilliertem Wasser verdünnten Bedingung des *Hampton Classic Screen* mit einer Zusammensetzung von 100 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM Tris-HCl, pH = 8.5 und 15 % (w/v) PEG 4000. Daraufhin durchgeführte Optimierungsansätze bei Variation der PEG 4000-Konzentration (12.5-17.5 % (w/v)) und des pH-Wertes der Tris-HCl-Komponente (pH = 7.5-8.0) lieferten innerhalb von 2-3 Monaten für die Röntgenstrukturanalyse ausreichend große Einkristalle. Diese konnten im Kristallisationspuffer durch eine Zugabe von 20 % (v/v) Glycerin als Frostschutzzusatz stabilisiert und für Röntgenstrukturuntersuchungen an einem Synchrotron in flüssigem Stickstoff weggefroren werden.



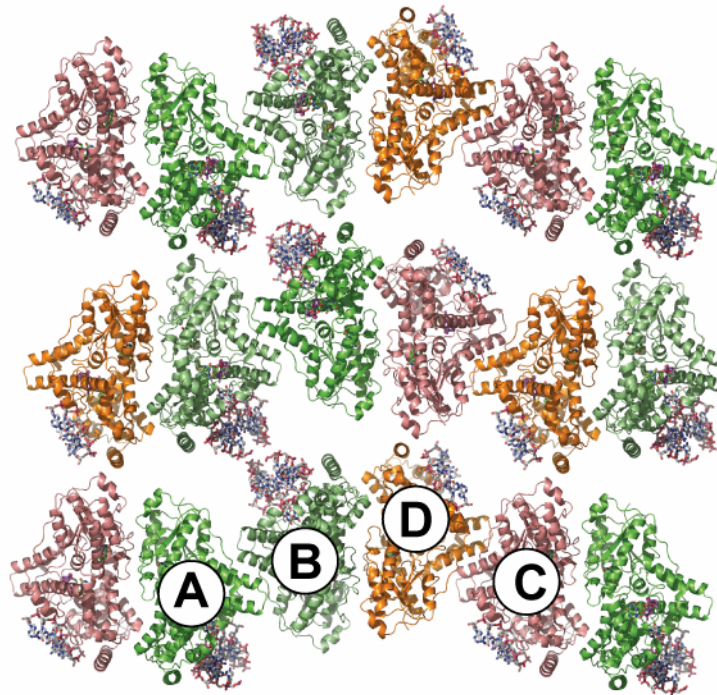
**Abbildung 4.1:** Cokristalle von *A. nidulans* Photolyase mit doppelsträngigem CPD-haltigem 14mer DNA-Oligonukleotid.

#### 4.1.3. Datensammlung und Strukturbestimmung der CPD-DNA/Photolyase Komplexe

Die Datensammlung der Cokristalle von *Anacystis nidulans* Photolyase und des 14mer Doppelstrang-DNA-Oligonukleotids, das auf einem Strang einen CPD-Schaden enthielt, erfolgte im Paul-Scherrer-Institut an der Synchrotron Beamline X06SA der Swiss Light Source (SLS) in Villigen, Schweiz, bei einer Temperatur von 100 K. Die Wellenlänge der verwendeten Synchrotronstrahlung lag bei  $\lambda = 0.9796 \text{ \AA}$ , fokussiert auf eine Größe von  $80 \times 20 \mu\text{m}^2$ .

Alle untersuchten Kristalle wiesen im Verlauf der Experimente deutliche, durch die intensive

Röntgenstrahlung verursachte, schwere Strahlenschädigungen auf, die sich in schwächer werdendem Diffraktionsvermögen manifestierten. Eine maximale Expositionszeit der Synchrotronstrahlung für 600 s wurde daher für die Sammlung eines vollständigen Datensatzes als Limit erachtet.



**Abbildung 4.2:** Kristallpackung von Cokristallen aus *A. nidulans* Photolyase und CPD-DNA mit den vier Komplexen A-D. Die Komplexe A und B (grün) enthalten gebundene Duplex-DNA, Komplexe C und D (orange) weisen nur einzelsträngige DNA auf.

Die erhaltenen Aufnahmen eines Einkristalls wurden indiziert, der vollständige Datensatz anschließend mit DENZO reduziert und in der Raumgruppe C2 bis zu einer Auflösung von 1.8 Å integriert [Otwinowski, 1997], wobei ein  $R_{\text{merge}}$  von 7.2 % für Daten von 30-1.8 Å erhalten wurde.. Die Strukturlösung erfolgte durch *molecular replacement* [Vagin, 1997] mit den bereits 1997 von Tamada *et al.* veröffentlichten Strukturdaten der DNA-Photolyase aus *Anacystis nidulans* (pdb-code: 1QNF) als Suchmodell [Tamada, 1997]. Die so erhaltene Lösung zeigte deutlich die Elektronendichte für an das Protein gebundene CPD-DNA. Die erhaltenen Zellparameter ( $a = 173.81$ ,  $b = 88.51$ ,  $c = 161.22$  Å) für die Komplexstruktur mit insgesamt vier Molekülen pro asymmetrischer Einheitszelle (Abbildung 4.2) weichen deutlich von denen des Modells 1QNF mit nur einem Molekül ab.

Datensammlung	<i>A. nidulans</i> CPD-DNA/Photolyase Komplex
Röntgenquelle & Wellenlänge	X06SA, SLS, Villigen, 0.9796
Detektor	MAR CCD 225 mm
Raumgruppe	C2
Dimensionen der Einheitszelle (Å)	173.81, 88.51, 161.22
Auflösung (Å)	30-1.8
Reflexionen; einzigartige Reflexionen	730050, 218105
Wilson B-Faktor (Å <sup>2</sup> )	25.9
$I/\sigma(I)$ <sup>a)</sup> ; $R_{\text{merge}}$ <sup>b)</sup>	13.9 (2.1), 0.072 (0.399)
Vollständigkeit (%)	96.3
Redundanz	3.3 (2.0)
Verfeinerungsstatistiken	
Auflösung (Å)	30-1.8
Reflexionen ( $F > 0\sigma$ )	210679
R-Faktor <sup>c)</sup> , $R_{\text{free}}$	0.206, 0.226
Gesamtzahl der Atome, Wassermoleküle	18208, 1614
r.m.s.d. Bindungen (Å); Winkel (°)	0.006, 1.199
mittlerer B-Faktor (Å <sup>2</sup> ) <sup>d)</sup>	30.3 (38.5, 49.8)

**Tabelle 4.3:** Datensammlung und Verfeinerungsstatistik des CPD-DNA/Photolyase-Komplexes

a) berechnet mit dem Programm TRUNCATE [CCP4, 1994]. b)  $R_{\text{merge}} = \frac{\sum \sum |I_j(h) - \langle I(h) \rangle|}{\sum \sum I_j(h)} \times 100$ ; die

Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale. c)  $R = \frac{\sum ||F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}||}{\sum |F_{\text{obs}}|}$ , mit  $k$  als Skalierungsfaktor. d) die Werte in Klammern beziehen sich auf DNA und Wassermoleküle.

Die manuelle Einpassung der Struktur in die gemessene Elektronendichte geschah mit dem Programm O [Jones, 1991], gestützt durch wiederholte Verfeinerungen mit CNS 1.1 [Brünger, 1998] unter Einbeziehung einer nicht-kristallographischen Symmetrie (NCS), bis Konvergenz bei einem R-Faktor von 20.6 % und einem freien R-Faktor von 22.6 % eintrat. Das resultierende, fertige Modell enthält in der asymmetrischen Einheitszelle vier DNA/Photolyase-Komplexe, bei denen das Protein jeweils von A2-I475 definiert ist, vier Moleküle FAD, vier Moleküle 8-HDF, zwei Magnesiumionen und 1614 Wassermoleküle. Die Besetzungszahl der DNA konnte über einen Vergleich der B-Faktoren der Oligonukleotide mit der näheren, angrenzenden Proteinumgebung auf etwa 80 % abgeschätzt werden.

Aufgrund von Kristallpackungseffekten und partieller Unordnung sind die Oligonukleotide in den einzelnen Komplexen nicht identisch definiert. In den beiden Komplexen A und B finden sich erwartungsgemäß von A1-C11 bzw. C6-A14 (CPD-Strang/Gegenstrang) definierte Duplex-DNA-Stränge, während sowohl in Komplex C als auch D nur einzelsträngige DNA von T8-C11 beziehungsweise G10-A14 in der Elektronendichte erkennbar ist und bei denen die CPD-Bindungstasche der Photolyase unbesetzt blieb.

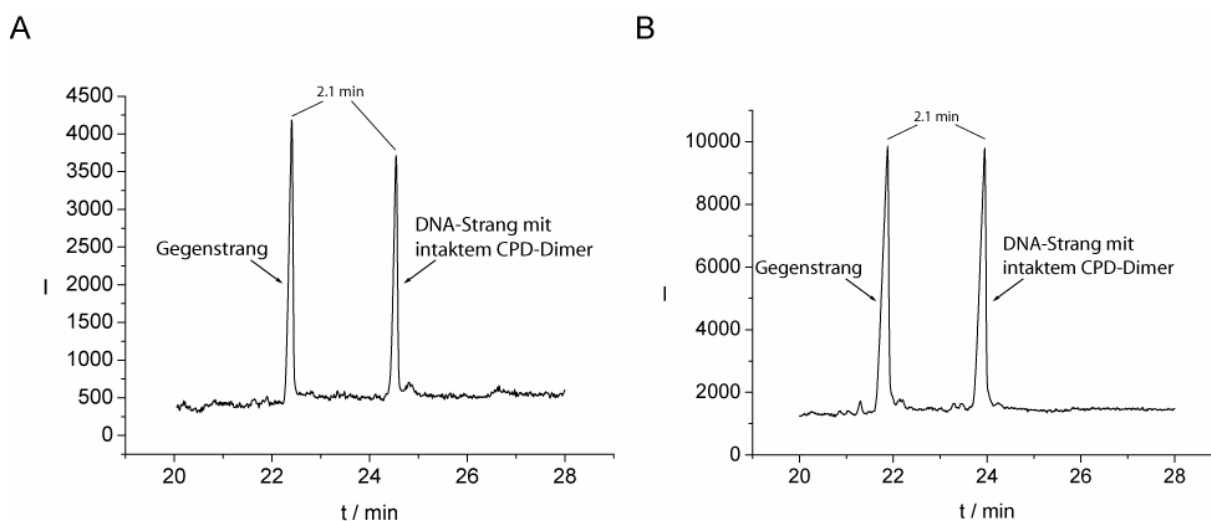
#### **4.1.4. Kontrolle des CPD-Schadens durch Kapillarelektrophorese**

Für kapillarelektrophoretische Untersuchungen des CPD-Schadens in Kristallen, die für eine unterschiedliche Dauer Synchrotronstrahlung ausgesetzt oder noch unbelichtet waren, wurden einzelne Cokristalle in je 10 µL Wasser aufgelöst. Um die Messung störende Spuren von Salzen aus dem Kristallisationspuffer zu entfernen, erfolgte eine 30-minütige Dialyse gegen eine auf Wasser liegende Membran.

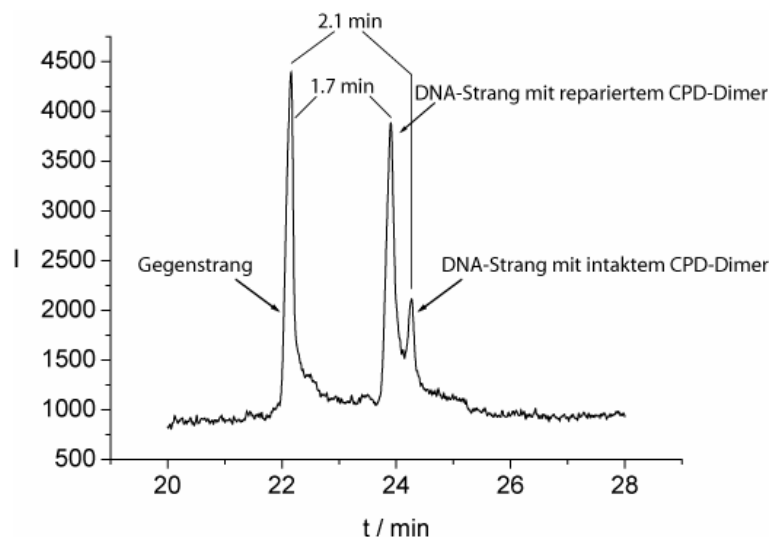
Diese Proben wurden einer Kapillarelektrophorese unterzogen. Hierbei betrug die Differenz der Retentionszeiten der beiden Peaks des CPD-Strangs und des Gegenstrangs 2.1 min (Abbildung 4.3, A). Bei Untersuchung eines Oligonukleotiddoppelstrangs mit intaktem CPD in proteinfreier Lösung korrelierte die Zeitdifferenz mit diesem Ergebnis (Abbildung 4.3, B).

Für einen direkten Vergleich wurde eine Coinjektion von einer aus einer unbelichteten Probe mit frisch hergestellter Doppelstrang-DNA und intaktem Dimer im Verhältnis 1:1 durchgeführt. Diese Coinjektion zeigt eindeutig, dass die beiden erhaltenen Peaks von dem T◊T-Dimer enthaltenden Strang und dem dazugehörigen Gegenstrang stammen.

Um einen Vergleich zu dem Verhalten eines reparierten CPD-haltigen DNA-Strangs zu erhalten, wurde eine Probe der *A. nidulans* Photolyase mit dem verwendeten Doppelstrang-Oligonukleotid unter Rotlichtbedingungen im Verhältnis 1:1.1 gemischt und für eine Stunde bei 366 nm und 4 °C belichtet. Die unter diesen Konditionen erfolgte Reparatur des CPD-Schadens konnte im Folgenden durch einen im CE-Elektropherogramm auftretenden dritten Peak nachgewiesen werden, der eine Retentionszeit von nur 1.7 min zum Gegenstrang aufweist (Abbildung 4.4). Dieses Experiment wurde, wie bereits das vorherige, als Coinjektion mit intakter CPD-Dimer enthaltender Doppelstrang-DNA ausgeführt.



**Abbildung 4.3:** Kapillarelektrophoretische Untersuchungen an *A. nidulans* Photolyase/DNA-Cokristallen. **A)** Bei Cokristallen, die für 2 s Synchrotronbestrahlung ausgesetzt waren, liegt die Differenz der Retentionszeiten der beiden Peaks von CPD-Strang und Gegenstrang bei 2.1 min. **B)** Die Coinjektion von intaktem CPD-Schaden in Doppelstrang-DNA und einem *A. nidulans* Photolyase/DNA-Cokristall nach 2 s Synchrotronbestrahlung zeigt eine identische Zeitdifferenz von 2.1 min für die Retention von Gegenstrang und dem DNA-Strang mit intaktem CPD-Dimer.



**Abbildung 4.4:** Kapillarelektrophoretische Untersuchung eines Photolyase/CPD-DNA-Cokristalls nach 1 h Belichtung bei 366 nm. Der DNA-Strang mit von *A. nidulans* Photolyase repariertem CPD-Dimer zeigt eine geringere Differenz der Retentionszeit zum Gegenstrang als der DNA-Strang mit intaktem CPD-Dimer.

Die kapillarelektrophoretischen Ergebnisse aus den durchgeführten Experimenten bestätigen somit eindeutig, dass eine Reparatur des Schadens nicht während der langen Kristallisationszeit von bis zu 12 Monaten, der weiteren Handhabung durch Beobachtungen am Mikroskop oder Wegfrieren erfolgt sein kann. Die rigorose Einhaltung von rotem Sicherheitslicht während aller Arbeitsschritte konnte daher eine frühzeitige, unbeabsichtigte lichtinduzierte Reparatur wirksam verhindern. Ebenso lässt sich konstatieren, dass eine nur kurzzeitige Einwirkung von Synchrotronstrahlung ( $\approx 2$  s) auf die Cokristalle keine reparaturinduzierende Wirkung besitzt und der Thymin-Thymin-Dimer-Schaden weiterhin intakt ist.

#### **4.2. Kristallisation von *A. thaliana* Cryptochrom 3**

Das in *E. coli* rekombinant überexprimierte und im Anschluss aufgereinigte Cryptochrom 3 aus *A. thaliana* [Daiyasu, 2004] wurde von Dr. Richard Pokorny (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Alfred Batschauer, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg) bereitgestellt. Der Puffer des für die Kristallisationsexperimente eingesetzten Proteins setzte sich zusammen aus 10 mM Tris-HCl, pH = 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol sowie 10 % Glycerin.

Erste Kristallisationsscreens mit *A. thaliana* Cryptochrom 3 erfolgten nach der gängigen *sitting drop* Methode (siehe Kapitel 3.4.2) bei Raumtemperatur in 96-*well* Kristallisationsplatten an einem Cartesian Microsys 4004 Kristallisationsroboter. Tropfenvolumina von je 300 nL Protein- und Reservoirlösung wurden über einem Reservoirvolumen mit 100  $\mu$ L Präzipitanslösung pipettiert. Die Proteinkonzentration betrug je nach Ansatz 5.0 bzw. 10.0 mg·mL<sup>-1</sup>. Nach einer Woche konnten erste Kristalle in einer Bedingung des *Sigma Cryo Kit* mit der Zusammensetzung 170 mM Ammoniumacetat, 85 mM Natriumcitrat, pH = 5.6, 25.5 % (w/v) PEG 4000 und 15 % (v/v) Glycerin beobachtet werden. Die anschließende systematische Optimierung der erhaltenen Bedingung im 24-*well* Format ergab bei Variation des pH-Wertes (3.8-5.6), der PEG 4000 Konzentration (21-28 % (w/v)), sowie des Glycerinanteils (5-15 % (v/v)) für die Röntgenstrukturanalyse geeignete Einkristalle nach einer Inkubationszeit von 3-7 Tagen (Abbildung 4.5). Aus der optimalen Bedingung (170 mM Ammoniumacetat, 85 mM Natriumcitrat, pH = 4.6, 21.5 % (w/v) PEG 4000, 7.5 % (v/v) Glycerin) gewonnene säulenförmige Kristalle von grün-gelber Farbe wurden direkt aus der Mutterlauge weggefroren.



**Abbildung 4.5:** Kristall von *A. thaliana* Cryptochrom 3. Die Abmessungen betragen etwa 0.2 x 0.1 x 0.1 mm.

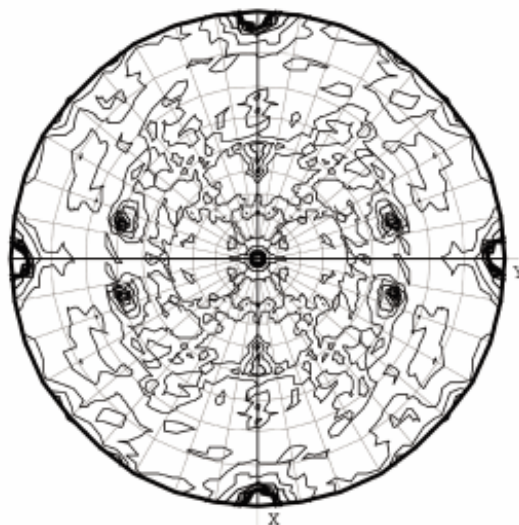
#### 4.2.1. Datensammlung und Strukturbestimmung von *A. thaliana* Cryptochrom 3

Die Datensammlung der *Arabidopsis thaliana* Cryptochrom 3 Kristalle erfolgte an der EMBL-Beamline X11 des DORIS III Speicherrings am DESY in Hamburg bei einer Temperatur von 100 K. Die Wellenlänge der verwendeten Synchrotronstrahlung lag bei  $\lambda = 0.8125 \text{ \AA}$ , fokussiert auf eine Größe von  $2 \times 0.4 \text{ mm}^2$ .

Ein vollständiger Datensatz eines gefrorenen Einkristalls wurde bis zu einer Auflösung von  $1.9 \text{ \AA}$  gesammelt und die Daten anschließend mit den Programmen MOSFLM und SCALA [CCP4, 1994] prozessiert. Aufgrund der systematischen Absenzen konnte die orthorhombische Raumgruppe  $P2_12_12_1$  eindeutig zugewiesen werden. Die Mosaizität des Datensatzes liegt bei  $0.27^\circ$ . Die erhaltenen Zellparameter betragen ( $a = 73.30$ ,  $b = 116.78$ ,  $c = 135.02 \text{ \AA}$ ) weshalb zwei Moleküle pro asymmetrischer Einheitszelle angenommen werden konnten. Über die mit MOLREP [CCP4, 1994] für Daten von  $20\text{--}2.5 \text{ \AA}$  berechnete Selbstrotationsfunktion konnte gezeigt werden, dass die beiden Cry3 Moleküle miteinander über eine zweifache, nicht-kristallographische Symmetrieachse ( $\theta = 120.4^\circ$ ,  $\phi = -73.6^\circ$ ) verknüpft sind.

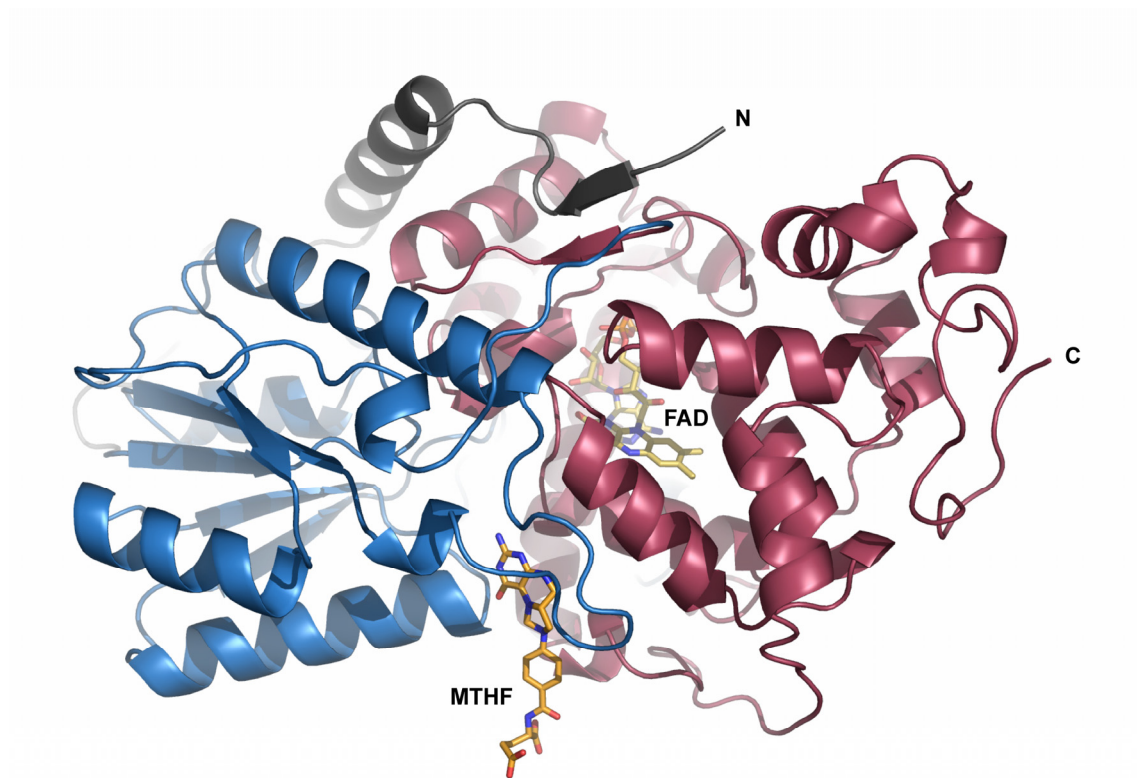
Die Strukturlösung erfolgte durch *molecular replacement* [Vagin, 1997] mit der 51 % Sequenzidentität für die Reste K39-L485 aufweisenden Struktur von CryDASH aus *Synechocystis* sp. PCC6803 CryDASH (pdb-code: 1NP7) [Brudler, 2003] als Suchmodell. Die auf diese Weise erhaltene Lösung liefert einen Korrelationskoeffizienten von 35.5 % und einen R-Faktor von 52.0 % für Daten von  $20\text{--}2.8 \text{ \AA}$ . Erwartungsgemäß liegt die mittlere quadratische Standardabweichung aufgrund der hohen Sequenzidentität von Cry3 und CryDASH mit  $0.91 \text{ \AA}$  für 419  $C_\alpha$ -Atome relativ niedrig.





**Abbildung 4.6:** Selbstrotationsfunktion eines *A. thaliana* Cryptochrom 3 Datensatzes bei einem Winkel von  $\chi = 180^\circ$ , berechnet mit Daten von 20.0-2.5 Å. Für die Berechnung wurde das Programm MOLREP verwendet.

Die aus dem *molecular replacement* resultierende, zumeist klar definierte Elektronendichte erlaubte es, nach Tracing und Remodellierung der Proteinstruktur mit ARP/wARP [Perrakis, 1999], fehlende kürzere Regionen des Cry3 Dimers eigenständig zu ergänzen. Die weitere Verfeinerung erfolgte durch manuelles Einpassen der Struktur in die gemessene Elektronendichte mit dem Programm Coot [Emsley, 2004], begleitet von wiederholten Verfeinerungszyklen mit CNS 1.1 [Brünger, 1998], bis zum Erreichen eines R-Faktors von 18.9 % und eines freien R-Faktors von 22.1 % für Daten von 20.0-1.9 Å. Das resultierende, fertige Modell enthält in der asymmetrischen Einheitszelle zwei Cryptochrom 3-Moleküle, bei denen das Protein jeweils von D2-G497 definiert ist, sowie zwei Moleküle FAD, zwei Moleküle MTHF und 172 Wassermoleküle (Abbildung 4.7).



**Abbildung 4.7:** Monomer der Gesamtstruktur von *Arabidopsis thaliana* Cryptochrom 3. Die N-terminale Verlängerung ist grau, die restliche Antennendomäne blau, die FAD bindende Domäne rot und die beiden Cofaktoren sind gelb bzw. orange visualisiert.

Datensammlung	Arabidopsis Cry3, Wildtyp
Röntgenquelle & Wellenlänge	X11, 0.8125 (Å)
Detektor	MAR CCD 165 mm
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Dimensionen der Einheitszelle (Å)	76.30, 116.78, 135.02
Auflösung (Å)	20-1.9
Reflexionen; einzigartige Reflexionen	417113; 93259
Mosaizität (°)	0.27
Wilson B-Faktor (Å <sup>2</sup> )	29
I/σ(I) <sup>a)</sup> , R <sub>merge</sub> <sup>b)</sup>	16.4 (2.2); 0.051 (0.448)
Vollständigkeit (%)	97.8 (85.7)
Verfeinerungsstatistiken	
Auflösung (Å)	20-1.9
Reflexionen (F>0σ)	93157
R-Faktor, R <sub>free</sub> <sup>c)</sup>	0.189 (0.319); 0.221 (0.390)
Gesamtzahl der Atome, Wassermoleküle, andere Heteroatome	8115, 172, 754
r.m.s.d. Bindungen (Å); Winkel (°)	0.008; 1.674

**Tabelle 4.4:** Datensammlung und Verfeinerungsstatistik von nativem Cryptochrom 3:

a) berechnet mit dem Programm TRUNCATE [CCP4, 1994]. b)  $R_{merge} = \frac{\sum \sum |I_j(h) - \langle I(h) \rangle|}{\sum \sum I_j(h)} \times 100$ ; die Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale. c)  $R = \frac{\sum |F_{obs} - F_{calc}|}{\sum F_{obs}}$ ;  $R_{free}$  wurde mit 1.5 % der Daten berechnet.

### 4.3. Cokristallisation von *A. thaliana* Cryptochrom 3 mit Thymindimer enthaltender ssDNA

Das für die Cokristallisation des Cryptochrom 3 aus *Arabidopsis thaliana* verwendete, nach rekombinanter Überexpression in *E. coli* aufgereinigte Protein wurde von Dr. Richard Pokorny (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Alfred Batschauer, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg) bereitgestellt.

Das verwendete, ein Cyclobutanpyrimidindimer enthaltende DNA-Oligonukleotid wurde von Ulrich Hennecke (Arbeitskreis Prof. Dr. Thomas Carell, Fachbereich Chemie und Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München) synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

#### 4.3.1. Proteinvorbereitung und Bindungsansatz

Für die Cokristallisation kam ein synthetisch hergestelltes, pentameres Oligonukleotid mit dem Analog eines *cis-syn*-Thymin-Thymin-Dimer-Schadens zum Einsatz, der über ein nicht hydrolisierbares Formacetal verknüpft war. Dieser zeigt die gleiche Stereochemie wie der natürliche Schaden und kann ebenso effektiv von Cryptochromen erkannt werden [Selby, 2006].

<b>CPD-Oligonukleotid</b>	<b>5' – TT=TTT – 3'</b>
---------------------------	-------------------------

**Tabelle 4.5:** Für die Cokristallisation mit *A. thaliana* Cryptochrome 3 eingesetztes 5mer Oligonukleotid mit CPD-Schaden.

Die Bindung des CPD-haltigen DNA-Einzelstrangs an das in seinem semireduzierten Zustand (FADH<sup>•</sup>) befindliche Protein erfolgte in einem Verhältnis von 1:1.1 unter Rotlichtbedingungen über einen Zeitraum von 24 Stunden bei 8 °C. Im Anschluss wurde der Bindungsansatz bis zum Erreichen einer Proteinkonzentration von 11 mg·mL<sup>-1</sup> durch Ultrafiltration über einen Konzentrator mit einem Ausschlussvolumen von 30 kDa konzentriert und partikelfrei filtriert.

#### 4.3.2. Kristallisation

Erste Kristallisationsscreens mit dem Bindungsansatz von *A. thaliana* Cryptochrom 3 mit einzelsträngiger DNA erfolgten nach der gängigen *sitting drop* Methode (siehe Kapitel 3.4.2) unter Rotlichtbedingungen bei Raumtemperatur in 96-*well* Kristallisationsplatten an einem Cartesian Microsys 4004 Kristallisationsroboter. Tropfenvolumina von je 300 nL Protein- und Reservoirlösung wurden über einem Reservoirvolumen mit 100 µL Präzipitanslösung pipettiert. Die Proteinkonzentration betrug je nach Ansatz 5.5 bzw. 11.0 mg·mL<sup>-1</sup>. Nach einer Woche konnten analog zum nativen Cry3 erste Kristalle in einer Bedingung des *Sigma Cryo Kit* mit der Zusammensetzung 170 mM Ammoniumacetat, 85 mM Natriumcitrat, pH = 5.6, 25.5 % (w/v) PEG 4000 und 15 % (v/v) Glycerin beobachtet werden. Die anschließende systematische Optimierung der erhaltenen Bedingung im 24-*well* Format ergab

bei Variation des pH-Wertes (3.8-5.6), der PEG 4000 Konzentration (21-28 % (w/v)) sowie des Glycerinanteils (5-15 % (v/v)) für die Röntgenstrukturanalyse geeignete Einkristalle nach einer Inkubationszeit von 3-7 Tagen (Abbildung 4.5). Aus der optimalen Bedingung (170 mM Ammoniumacetat, 85 mM Natriumcitrat, pH = 4.4, 21.5 % (w/v) PEG 4000, 7.5 % (v/v) Glycerin) gewonnene säulenförmige Kristalle wurden direkt aus der Mutterlauge weggefroren.



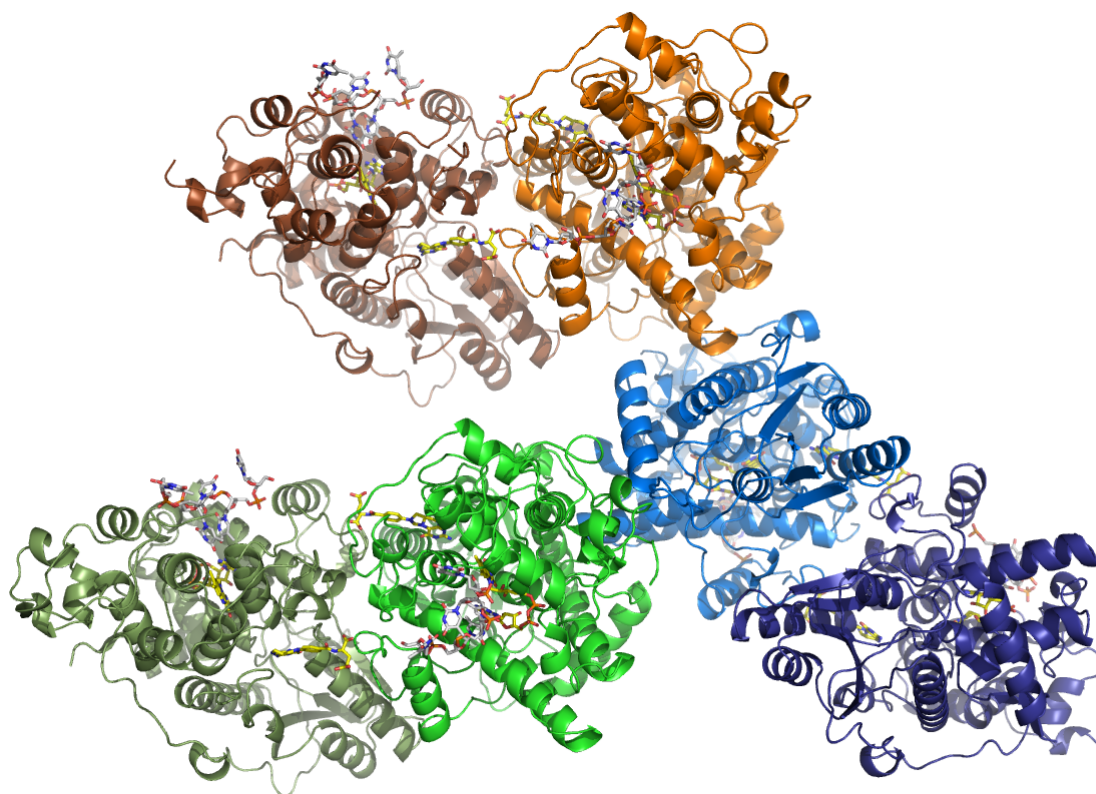
**Abbildung 4.8:** Cokristalle von *A. thaliana* Cryptochrom 3 mit pentamerer CPD-haltiger Einzelstrang-DNA. Die Abmessungen betragen etwa 0.2 x 0.1 x 0.1 mm.

#### 4.3.3. Datensammlung und Strukturbestimmung der CPD-DNA/Cryptochrom 3 Komplexe

Die Sammlung der Daten der *Arabidopsis thaliana* Cryptochrom 3 Kristalle erfolgte an der EMBL-Beamline X11 des DORIS III Speicherrings am DESY in Hamburg bei einer Temperatur von 100 K. Die Wellenlänge der verwendeten Synchrotronstrahlung lag bei  $\lambda = 0.9184 \text{ \AA}$ , fokussiert auf eine Größe von  $2 \times 0.4 \text{ mm}^2$ .

Ein vollständiger Datensatz eines gefrorenen Einkristalls wurde bis zu einer Auflösung von  $2.0 \text{ \AA}$  gesammelt. Die Daten wurden anschließend mit den Programmen MOSFLM und

SCALA [CCP4, 1994] prozessiert. Aufgrund der systematischen Absenzen konnte die orthorhombische Raumgruppe  $P2_12_12_1$  eindeutig zugewiesen werden. Die Mosaizität des Datensatzes wurde mit  $0.40^\circ$  bestimmt. Die erhaltenen Zellparameter betragen ( $a = 120.73$ ,  $b = 136.08$ ,  $c = 211.48 \text{ \AA}$ ) mit drei Cryptochrom 3-Dimeren pro asymmetrischer Einheitszelle. Die Strukturlösung erfolgte durch *molecular replacement* [Vagin, 1997] mit der nativen Cryptochrom 3 Struktur aus *Anacystis nidulans* (pdb-code: 2J4D) [Klar, 2007] als Suchmodell.



**Abbildung 4.9:** Darstellung des Inhalts der asymmetrischen Einheitszelle von Cokristallen aus *A. thaliana* Cryptochrom 3 und 5mer CPD-ssDNA mit den drei Dimeren der sechs Komplexe A bis F.

Die aus dem *molecular replacement* resultierende, zumeist klar definierte Elektronendichte erlaubte es, nach Tracing und Remodellierung der Proteinstruktur mit ARP/wARP [Perrakis, 1999], fehlende kürzere Regionen des Cry3 Dimers eigenständig zu ergänzen. Die weitere Verfeinerung erfolgte durch manuelles Einpassen der Struktur in die gemessene Elektronendichte mit dem Programm Coot [Emsley, 2004], begleitet von wiederholten

Verfeinerungszyklen mit Refmac5 [Murshudov, 1997], bis zum Erreichen eines vorläufigen R-Faktors von  $R = 20.8 \%$  und einem freien R-Faktor von  $R_{\text{free}} = 23.8 \%$  für Strukturdaten von  $20.0\text{-}2.0 \text{ \AA}$ . Das resultierende vorläufige Modell enthält in der asymmetrischen Einheitszelle drei Cryptochrom 3-Dimere, bei denen das Protein jeweils von D2-G497 definiert ist, sowie sechs Moleküle FAD, sechs Moleküle MTHF, sechs  $T_5$ -Oligonukleotide, 8 Chloridionen und 1275 Wassermoleküle (Abbildung 4.9).

Datensammlung	Arabidopsis CPD-DNA/Cryptochrom Komplex
Röntgenquelle & Wellenlänge	BW7A, EMBL Hamburg, $0.9184 \text{ \AA}$
Detektor	MAR CCD 165 mm
Raumgruppe	$P2_12_12_1$
Dimensionen der Einheitszelle ( $\text{\AA}$ )	120.73, 136.08, 211.48
Auflösung ( $\text{\AA}$ )	15.1-2.0
Reflexionen	227597
Mosaizität ( $^\circ$ )	0.40
Wilson B-Faktor ( $\text{\AA}^2$ )	28.8
$I/\sigma(I)$ <sup>a)</sup> ; $R_{\text{merge}}$ <sup>b)</sup>	14.0 (2.3), 0.093 (0.382)
Vollständigkeit (%)	99.1 (85.8)
<b>Verfeinerungsstatistiken</b>	
Auflösung ( $\text{\AA}$ )	15.1-2.0
R-Faktor <sup>c)</sup> , $R_{\text{free}}$	20.8, 23.8
Gesamtzahl der Atome, Wassermoleküle	26158, 1275
r.m.s.d. Bindungen ( $\text{\AA}$ ), Winkel ( $^\circ$ )	0.011, 1.329

**Tabelle 4.6:** Datensammlung und Verfeinerungsstatistik des CPD-DNA/Cryptochrom-Komplexes:

a) berechnet mit dem Programm TRUNCATE [CCP4, 1994]. b)  $R_{\text{merge}} = \frac{\sum \sum |I_j(h) - \langle I(h) \rangle|}{\sum \sum I_j(h)} \times 100$ ; die

Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale. c)  $R = \frac{\sum ||F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}||}{\sum |F_{\text{obs}}|}$ , mit  $k$  als Skalierungsfaktor.

#### **4.4. Natürliche und artifizielle Antennenchromophore in *T. thermophilus***

##### **DNA-Photolyase**

Neben dem katalytischen Cofaktor FAD ist in vielen weiteren CPD-Photolyasen ein weiterer Antennenchromophor nichtkovalent gebunden, welches das Aktivitätsspektrum der betreffenden Photolyase erweitert. Die kristallographische und funktionelle Analyse der Klasse I Photolyase aus *Thermus thermophilus* hat ergeben, dass bei der rekombinanten Expression dieses Enzyms in *E. coli* Flavinmononukleotid (FMN) als Antennencofaktor gebunden ist [Ueda, 2005; Klar, 2003]. Der in diesem Fall beobachtete Bindungsmodus entspricht nahezu der Bindung des Deazaflavins in der verwandten Klasse I DNA-Photolyase aus *Anacystis nidulans*. Bislang konnten, von dieser Ausnahme abgesehen, ausschließlich CPD-Photolyasen mit den Antennencofaktoren 5,10-Methenyltetrahydrofolat (MTHF) oder 7,8-Didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin (8-HDF) identifiziert werden. In vielen charakterisierten CPD-Photolyasen gelang die Identifizierung eines zweiten Cofaktors bisher nicht.

Die Generierung einer Mutante der *Thermus* Photolyase, der ein wichtiges konserviertes Arginin in der Bindungstasche für das Antennenchromophor fehlt, soll dessen Bedeutung für die Größe der Enzymaktivität unter Blaulichtbestrahlung demonstrieren.

Das Ziel war ebenso, verschiedene natürliche und synthetische Analoga des Deazaflavins als alternative Antennenchromophore zur Erweiterung und Modifizierung des Aktivitätsspektrums von CPD-Photolyasen einzusetzen.

##### **4.4.1. Generierung der R46E Mutante von *T. thermophilus* DNA-Photolyase**

Die Mutagenese wurde auf die in Kapitel 3.2.12 beschriebene Weise mit Hilfe der in Tabelle 4.7 aufgelisteten Mutagenese-Primer und dem Vektorkonstrukt pET36b(+)-tth-ph [Klar, 2003] als Templat durchgeführt. Als ursprüngliche Quelle des die Photolyase codierenden Gens diente die genomische DNA aus dem *Thermus thermophilus* Stamm HB8.

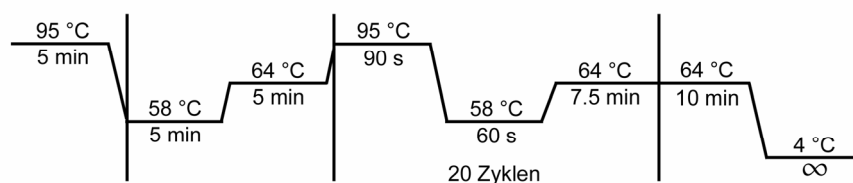


Bezeichnung	Sequenz
R46E_up	5'-CCCCGAGGGAGCGGGCC-3'
R46E_down	5'-CAGGCCCGCTCCCTCGG-3'

**Tabelle 4.7:** Mutagenese-Primer für die ortsspezifische Mutagenese zu R46E der *T. thermophilus* Photolyase.

Abweichend von dem vorgegebenen Temperaturschema für die Mutagenese-PCR wurden einige Modifikationen des Protokolls vorgenommen (Abbildung 4.10), um mit dem sehr GC-reichen Gen der *T. thermophilus* Photolyase und den demzufolge ebenfalls überwiegend GC-haltigen Primern eine vollständige und ausreichende Amplifikation zu erreichen. Die Zusammensetzung der Reaktionsmischung wurde um den Zusatz von 2 mM MgSO<sub>4</sub> zur Erhöhung der Annealingfähigkeit der Primer und besseren Denaturierung des Templats erweitert. Hinzu kam ferner eine Beimischung von 10 % (v/v) DMSO, das als Cosolvens ebenfalls die Denaturierung GC-reicher DNA unterstützt und mögliche Probleme verringert, die während der Amplifikation durch Sekundärstrukturelemente auftreten können (Tabelle 4.8) [Smith, 1990].

Die nach der Mutagenese-Reaktion erhaltenen Transformanten wurden durch Verdau mit NdeI und EcoRI auf die korrekte Insertgröße überprüft. Proben, die Fragmente der richtigen Größe enthielten, wurden durch eine DNA-Sequenzanalyse verifiziert und anschließend in den Expressionsstamm *E. coli* BL21-CodonPlus®(DE3)-RIL transformiert.



**Abbildung 4.10:** Temperaturprofil der Mutagenese-PCR.

---

0.5 µL	Templat
1 µL	dNTP-Mix
2.5 µL	10x Pfu-Puffer
1.2 µL	up-Primer (60 ng)
1.2 µL	down-Primer (60 ng)
0.5 µL	MgSO <sub>4</sub> (100 mM)
2.5 µL	DMSO
14.6 µL	ddH <sub>2</sub> O
1 µL	PfuTurbo <sup>®</sup> -Polymerase
<hr/>	
25 µL	

---

**Tabelle 4.8:** Zusammensetzung einer Mutagenese-PCR.

#### 4.4.2. Expression und Aufreinigung nativer DNA Photolyase und R46E Mutante

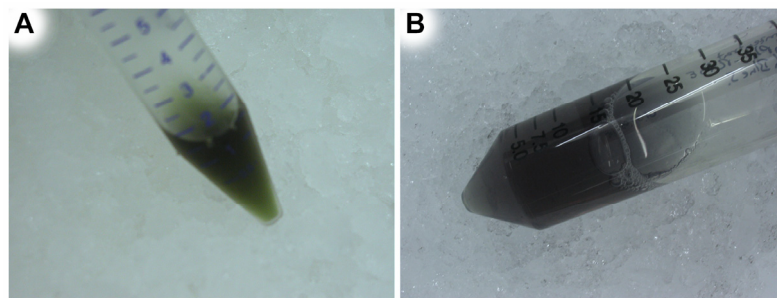
Die rekombinante Expression und Aufreinigung der DNA-Photolyase aus *Thermus thermophilus* erfolgte nach einer bereits vorliegenden diesbezüglichen Optimierung [Klar, 2003]. Die Expression erfolgte über Autoinduktion [Grossman, 1998; Kelley, 1995]. Für die dargestellte und ebenfalls zu exprimierende und aufzureinigende R46E-Mutante wurden die Vorgänge analog übernommen.

Ein Ansatz zur Expression der Photolyase im präparativen Maßstab erfolgte mit fünf 2-Liter-Kulturen in 5-Liter-Schikanekolben in TB-Medium über einen Zeitraum von 20 h bei 37 °C. Als Bakterienstamm diente *E. coli* BL21-CodonPlus<sup>®</sup>(DE3)-RIL-pET36-tth-ph bzw. *E. coli* BL21-CodonPlus<sup>®</sup>(DE3)-RIL-pET36-tth-ph-R46E. Die Zellen wurden geerntet (30 min, 8000 rpm, 4 °C), in AM-Medium resuspendiert und bis zur Weiterverwendung am nächsten Tag bei -80 °C tiefgefroren. Vor dem Aufschluss mit einem Emulsifier wurde den aufgetauten Zellen die benötigte Menge PMSF (0.1 M, 0.001 % (v/v)) zugesetzt. Nach dem Zellaufschluss wurden die Zelldebris durch Zentrifugation (JA10, 30 min, 8000 rpm, 4 °C) abgetrennt und der erhaltene lösliche Überstand abgenommen. Da regelmäßig die Löslichkeit der Proteine aufgrund der großen Zellmasse überschritten war, wurde das Pellet anschließend mit einigen Millilitern AM-Medium resuspendiert und die daraus entstandene Suspension erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt zweimal wiederholt und die einzelnen

Überstände vereinigt.

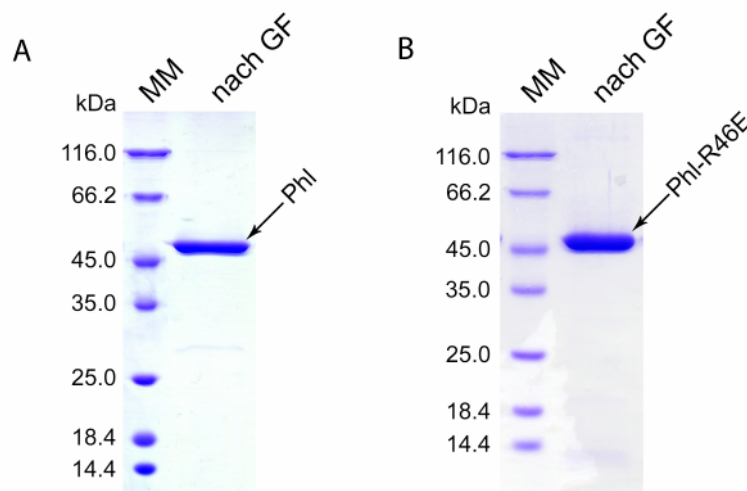
Eine anschließende Hitzedenaturierung (15 min, 65 °C) entfernte einen Großteil der endogenen *E. coli* Proteine. Nach Zentrifugation (JA20, 20 min, 14000 rpm, 4 °C) und Sterilfiltration (Porengröße: 0.22 µm) des löslichen Überstands aus der Hitzedenaturierung wurde dieser zur weiteren säulenchromatographischen Aufreinigung über einen Superloop auf eine Blue Sepharose CL-6B Säule aufgetragen.

Sowohl die native Photolyase als auch die R46E-Mutante eluieren nahezu vollständig und rein in einem ansteigenden Salzgradienten bei einer Salzkonzentration von 1 M Kaliumchlorid. Proteinhaltige Fraktionen von gelb-grüner Farbe (R46E: blau) wurden nach Kontrolle auf einem 12 % SDS-PAGE kombiniert und durch Ultrafiltration auf einem Konzentrator mit einem Ausschlussvolumen von 30 kDa bis zu einer Proteinkonzentration von ca. 20 mg·mL<sup>-1</sup> konzentriert (Abbildung 4.11).



**Abbildung 4.11:** konzentrierte *Thermus thermophilus* DNA-Photolyase ( $c \approx 20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). **A)** nativ **B)** R46E-Mutante

Diese dunkelgrün gefärbte (R46E: dunkelblau), konzentrierte Proteinlösung wurde im Anschluss durch Gelfiltrationschromatographie mit Sephacryl S200-HR vollständig von restlichen Verunreinigungen befreit und lieferte die aufgereinigte native Photolyase bzw. die R46E-Mutante in einer Gesamtausbeute von 35 mg pro Liter Zellkultur. Die über einen Zeitraum von mehreren Wochen bei 4 °C außerordentlich stabile, radikalische Form der *T. thermophilus* Photolyase ist im 12 % SDS-PAGE mit einer Bande bei apparenten 47 kDa sichtbar (Abbildung 4.12).



**Abbildung 4.12:** SDS-PAGE-Gele (12 %) der aufgereinigten (A) nativen und (B) R46E-Mutante von *Thermus thermophilus* DNA-Photolyase nach Gelfiltration mit Sephacryl S200-HR.

#### 4.4.3. Quantifizierung der Flavin-Chromophore

Nach der Aufreinigung der rekombinant exprimierten Photolyase wurden die gebundenen Cofaktoren massenspektrometrisch nachgewiesen. Analog verfahren wurde mit der FMN-rekonstituierten Photolyase und der dargestellten R46E-Mutante.

Zu diesem Zweck erfolgte ein Verdau mit Pepsin ( $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) in 10 mM Essigsäure/NaOH pH = 4.0 (16 h,  $4^\circ \text{C}$ ). Als Vergleichsstandards dienten FAD und FMN.

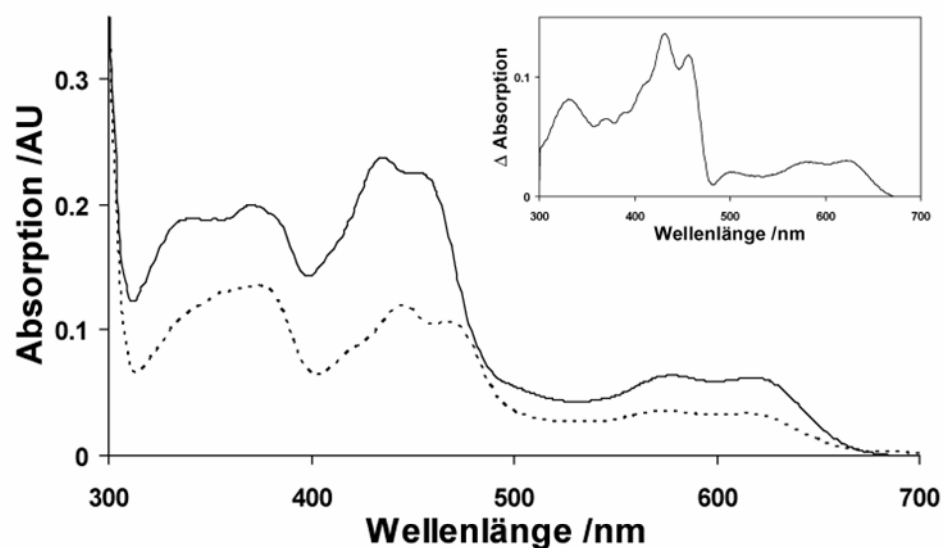
Die Proben wurden einmal mit Chloroform extrahiert und die vorhandenen Chromophore auf einer Nucleosil 100-10 C18-Säule (*Macherey-Nagel*) aufgetrennt. Der für die Elution verwendete 10-60 % Methanol-Gradient in 10 mM Tris-HCl, pH = 8.0 wurde innerhalb von 11 mL bei einer Flussrate von  $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  durchlaufen. Die Quantifizierung der Cofaktoren erfolgte über einen direkten Vergleich der Peakflächen der entsprechenden Probe mit den Standards.

Das Ergebnis der quantitativen Analyse zeigt, dass die beiden Cofaktoren FAD und FMN in der mit FMN-rekonstituierten Photolyase in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 gebunden sind. Die dargestellte R46E-Mutante zeigt nur eine Bindung von FAD und weist erwartungsgemäß keine Bindung von FMN auf.

#### 4.4.4. UV/Vis-Spektroskopie

Das UV/Vis-Spektrum der aufgereinigten nativen Photolyase aus *Thermus thermophilus*, aufgenommen bei einer Proteinkonzentration von  $c = 1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  und einer Temperatur von  $18^\circ\text{C}$ , zeigt deutliche Doppelmaxima bei 338 nm und 369 nm, 435 nm und 454 nm, sowie 579 nm und 617 nm. Peaks bei 435 nm und 454 nm sind charakteristisch für proteingebundene, vollständig oxidierte Flavine in Photolyasen. Dies schließt sowohl das katalytische FAD als auch das in diesem Fall in der Antennendomäne lokalisierte FMN ein, das während des Aufreinigungsprozesses unter Hochsalzbedingungen teilweise aus dem Protein entfernt wurde. Auffällig ist eine bei der FMN-freien Mutante im Vergleich zum Wildtyp in dieser spezifischen Region auftretende Rotverschiebung um etwa 10 nm.

Im Bereich von etwa 550 nm bis 700 nm ist eindeutig die Absorption der neutralen, semichinoiden Radikalform des katalytischen Cofaktors  $\text{FADH}^\bullet$  zu sehen, die durch saure Oxidation des Proteins mit Phosphorsäure unter Bildung des nicht absorbierenden  $\text{FADH}$  nicht mehr auftritt. Das nach Säurebehandlung erhaltene Spektrum entspricht dann weitestgehend dem von freiem FAD in wässriger Lösung [Kato, 1997].



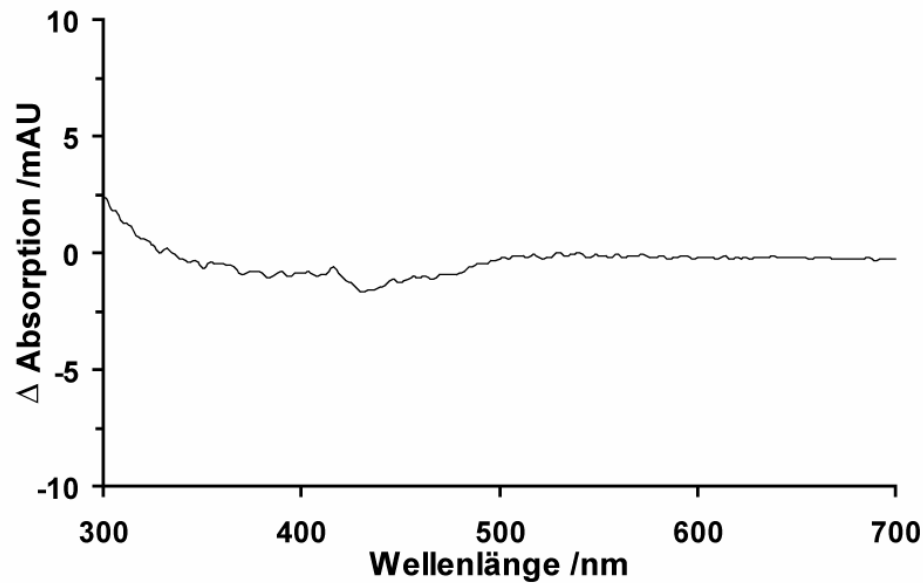
**Abbildung 4.13:** UV/Vis-Absorptionsspektren von *T. thermophilus* Wildtyp (durchgezogene Linie) und R46E-Mutante (gepunktete Linie) Photolyase ( $c = 1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Der Ausschnitt zeigt das Differenzspektrum der beiden Absorptionsspektren.

Aufgrund des in der R46E-Mutante fehlenden Antennenchromophors sind alle durch Absorption von gebundenen Flavinen bedingten Maxima deutlich schwächer ausgeprägt als im Wildtyp. Die nach der Aufreinigung der Wildtyp Photolyase erhaltene dunkelgrün gefärbte Lösung deutet auf das gleichzeitige Vorliegen der blauen, semichinoiden Radikalform und der gelben, vollständig oxidierten Form des Flavins hin. Im Gegensatz hierzu besitzt die aufgereinigte R46E-Photolyase-Mutante eine dunkelblaue Färbung. Diese wird wahrscheinlich durch einen Elektronentransfer des Farbstoffs Cibacron Blue F3G-A auf das FAD hervorgerufen, der kovalent an die Blue-Sepharose-Matrix der während der Aufreinigung verwendeten Säule gebundenen ist. Dies legt den Schluss nahe, dass FMN überwiegend in seiner oxidierten Form an die *Thermus thermophilus* Photolyase gebunden ist.

### 4.4.5. Photoaktivierung

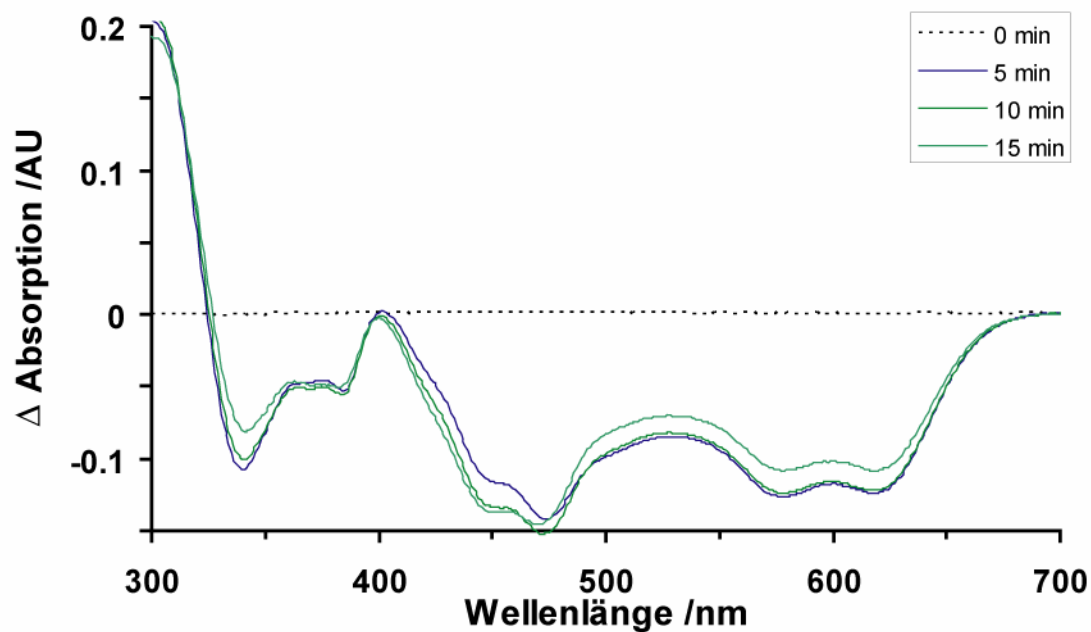
Der katalytische Cofaktor FAD in Photolyasen liegt zumeist vollständig oxidiert oder halb reduziert in seiner neutralen, semichinoiden Radikalform vor. Der die katalytisch aktive Spezies  $\text{FADH}^\cdot$  durch lichtgetriebene Reduktion erzeugende Prozess wird als Photoaktivierung bezeichnet [Saxena, 2005; Cheung, 1999; Kim, 1992]. Erste Experimente, dies unter aeroben Bedingungen in Gegenwart von DTT als Elektronendonator zu erreichen, resultierten in keiner spektroskopisch nachweisbaren Akkumulation des vollreduzierten Zustands. Ein vollständiger Ausschluss von Sauerstoff, und damit strikt anaerobe Bedingungen, wurde durch die Zugabe von Glukoseoxidase (GOD) als Sauerstofffänger sowie die Übersichtung der Reaktionsgefäße mit Paraffinöl gewährleistet.

Das Referenzspektrum (Abbildung 4.14) zeigt die Differenz der Glukoseoxidaspektren, die ohne Gegenwart von Photolyase im Reaktionspuffer vor Beginn und nach 32-minütiger Bestrahlung mit Weißlicht aufgenommen wurden. Die Kontinuität der Absorptionseigenschaften der GOD im gesamten Verlauf des Experiments sorgt für vergleichbare Spektren der einzelnen Photoaktivierungen. Auch bei zu Studien der Photoreaktivierung durchgeführten ELISA Aktivitätsassays (siehe Kapitel 4.4.6) kam die Glukoseoxidase zum Einsatz.

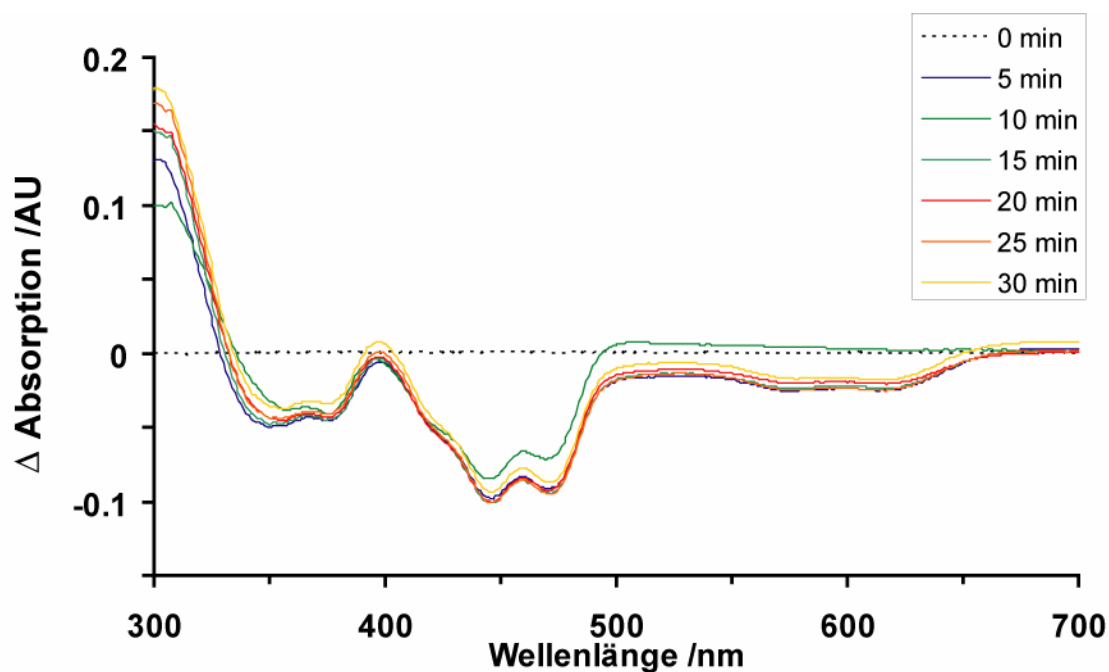


**Abbildung 4.14:** Glucoseoxidase-Referenzspektrum nach 32-minütiger Bestrahlung mit Weißlicht.

Die Photoreduktion mit Weißlicht ( $\lambda_{\text{max}} = 320 \text{ nm}$ ) erfolgt sowohl beim Wildtyp als auch der R46E-Mutante innerhalb von etwa 10 min bis zum Erreichen einer Sättigung des vollreduzierten Zustands im vorhandenen FAD. Die rapide Abnahme des vollständig oxidierten FAD ist deutlich an der starken Verringerung der Absorptionsbanden bei 445 nm und 470 nm erkennbar (Abbildung 4.15). Fast ebenso schnell sinkt beim Wildtyp auch die Absorption im Bereich von 550 nm bis 700 nm ab, was die vollständige Reduktion zum katalytisch aktiven  $\text{FADH}^-$  bedeutet, ohne dass die Reaktion beim  $\text{FADH}^\bullet$  stoppt. Die Photoaktivierung der R46E-Mutante läuft bei Weißlichtbestrahlung ähnlich schnell ab wie beim Wildtyp, da auch hier bereits nach ungefähr 10 min keine Änderungen am Absorptionsverhalten mehr erkennbar sind (Abbildung 4.16). Allerdings ist hier die Absorptionsdifferenz im Bereich über 500 nm etwa um den Faktor vier geringer. In einem überlagerten Vergleichsspektrum (Abbildung 4.17) sind die unterschiedlichen Absorptionseigenschaften nach Weißlichtbestrahlung deutlich zu erkennen.

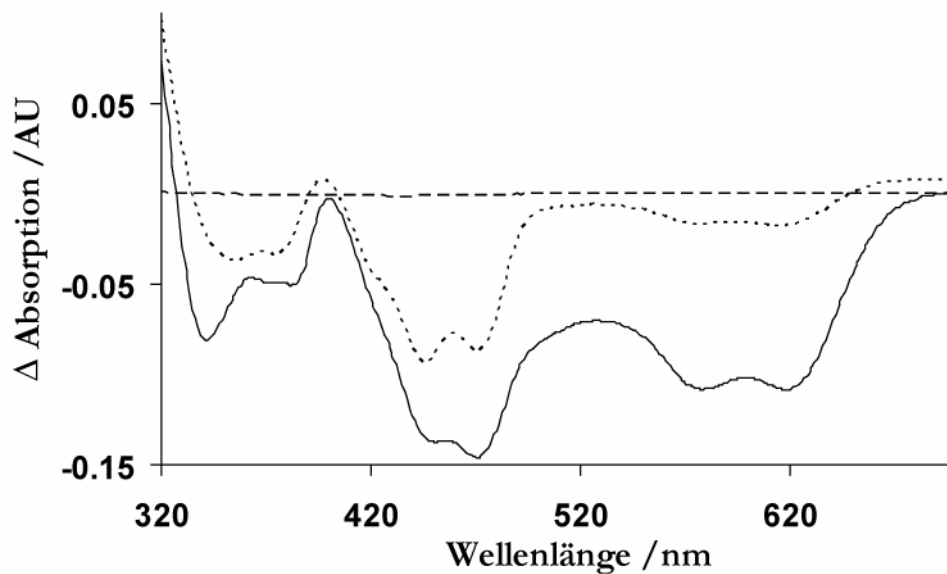


**Abbildung 4.15:** Photoaktivierungsspektren von Wildtyp *T. thermophilus* Photolyase zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung mit Weißlicht ( $\lambda_{\text{max}} = 320 \text{ nm}$ ).



**Abbildung 4.16:** Photoaktivierungsspektren der R46E-Mutante von *T. thermophilus* Photolyase zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung mit Weißlicht ( $\lambda_{\text{max}} = 320 \text{ nm}$ ).



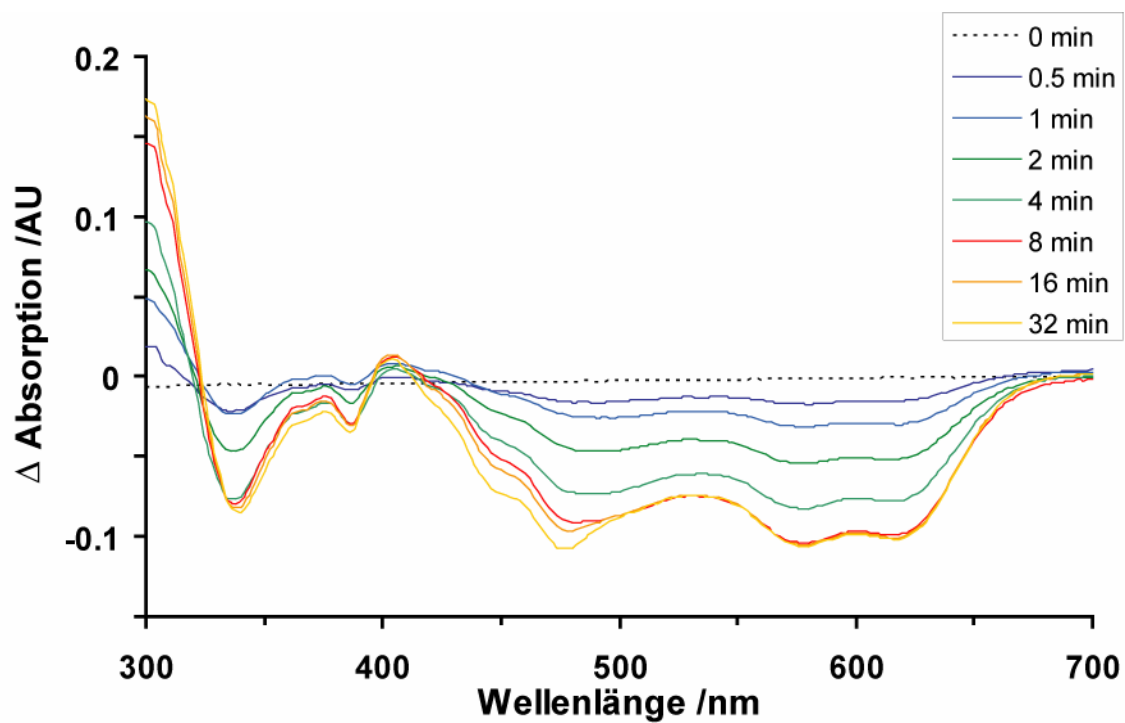


**Abbildung 4.17:** Photoaktivierungsspektren von Wildtyp (durchgezogene Linie) und R46E-Mutante (gepunktete Linie) der *T. thermophilus* Photolyase unter Bestrahlung mit Weißlicht nach 32 Minuten. Als Referenz ist das ebenfalls nach Bestrahlung aufgenommene Differenzabsorptionsspektrum der Glukoseoxidase im Reaktionspuffer ohne Photolyase (gestrichelte Linie) angegeben.

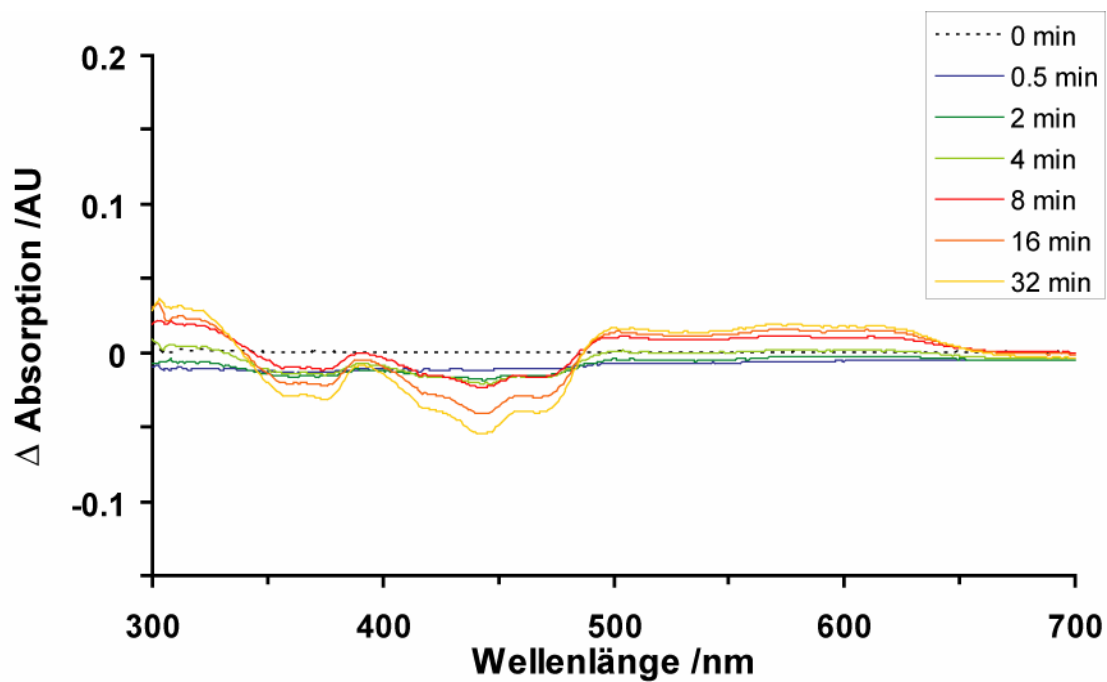
Nach einer Blaulichtbestrahlung ( $\lambda_{\text{max}} = 447 \text{ nm}$ ) unterscheiden sich die Spektren von Wildtyp und R46E-Mutante hingegen deutlich voneinander. Die native Photolyase zeigt über den gesamten Absorptionsbereich eine der Bestrahlung mit Weißlicht identische Verhaltensweise (Abbildung 4.18). Auch die hohe Geschwindigkeit der Reduktion ist miteinander vergleichbar. Die FMN-freie Mutante indessen akkumuliert im Verlauf der Reaktion unter Teilreduktion des FADH weiteres semireduziertes FADH<sup>•</sup> (Abbildung 4.19, Abbildung 4.20).

Das FMN spielt also als Antennenchromophor eine wichtige Rolle, indem es eine Energieübertragung auf den katalytischen Cofaktor FAD bewerkstelligt und diesen in den katalytisch aktiven Redoxzustand FADH<sup>•</sup> bringt. Bei der R46E-Mutante kann dies nur bei Bestrahlung mit Weißlicht geschehen, wohingegen sie durch blaues Licht nicht katalytisch aktiviert werden kann.

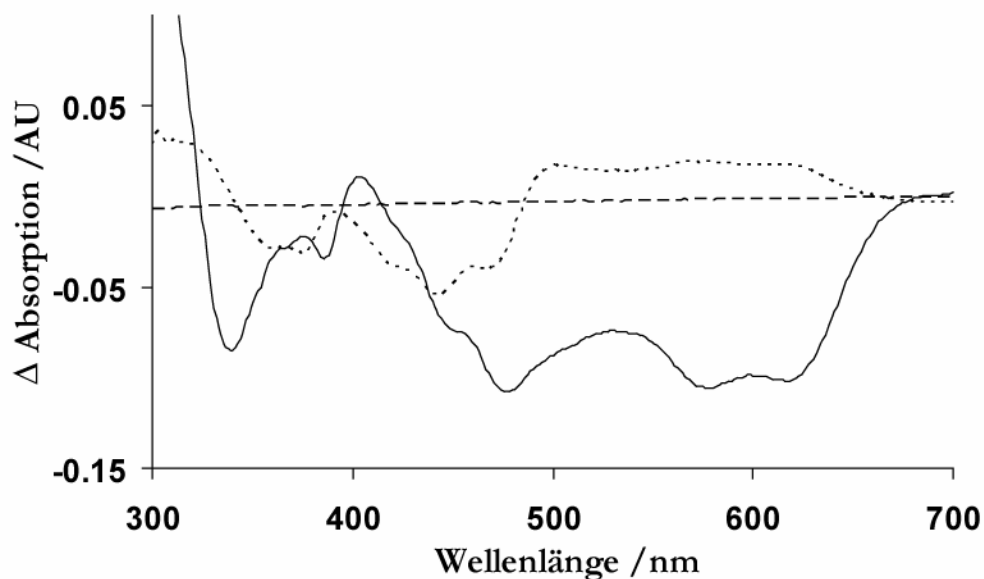
Die Stabilität des vollständig reduzierten FADH<sup>•</sup> ist, wie die ersten Versuche ohne Gegenwart von GOD belegen, selbst in einer anaeroben Umgebung relativ gering, da schnell eine partielle Oxidation des Flavins, auch unter Rotlichtbedingungen, eintritt.



**Abbildung 4.18:** Photoaktivierungsspektren von Wildtyp *T. thermophilus* Photolyase zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung mit Blaulicht ( $\lambda_{\text{max}} = 447 \text{ nm}$ ).



**Abbildung 4.19:** Photoaktivierungsspektren der R46E-Mutante von *T. thermophilus* Photolyase zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung mit Blaulicht ( $\lambda_{\text{max}} = 447 \text{ nm}$ ).



**Abbildung 4.20:** Photoaktivierungsspektren von Wildtyp (durchgezogene Linie) und R46E-Mutante (gepunktete Linie) der *T. thermophilus* Photolyase unter Bestrahlung mit Blaulicht ( $\lambda = 447$  nm) nach 32 Minuten. Als Referenz ist das Differenzabsorptionsspektrum einer identischen Probe der Wildtyp Photolyase vor der Bestrahlung (gestrichelte Linie) angegeben.

#### 4.4.6. ELISA Aktivitätsassays zur Photoreaktivierung

Die Photoreaktivierung bezeichnet die Elektronenübertragung vom angeregten, vollständig reduzierten und katalytisch aktiven Cofaktor  $^*\text{FADH}^-$  auf das enzymgebundene Pyrimidindimer. Sie wird nach der Dimerspaltung mit der Rückübertragung des Elektrons auf das  $\text{FADH}^-$  unter Regeneration von  $\text{FADH}^-$  abgeschlossen.

Verschiedene Aktivierungsassays wurden an weißlichtbestrahlten reduzierten Photolyaseproben mit monochromatischem UV-A ( $\lambda = 370$  nm) und Blaulicht ( $\lambda = 450$  nm) durchgeführt. Aufgrund der hohen Redox-Sensibilität des für die Katalyse notwendigen  $\text{FADH}^-$  kam der Einhaltung eines strikt anaeroben Glukoseoxidase-haltigen Milieus besondere Bedeutung zu.

Der ELISA-Aktivitätsassay wurde mit einigen speziellen Modifikationen nach Hada [Hada, 2000] durchgeführt. Alle Photoreaktivierungsexperimente wurden in einer 3 mL Küvette durchgeführt, die mit Paraffinöl überschichtet war. Vorhandener Sauerstoff konnte unter diesen Bedingungen nach 200 min durch Glukoseoxidase quantitativ abgefangen werden, was

durch die Farbveränderung des zugegebenen sauerstoffsensitiven Farbstoffs Resazurin bestätigt wurde. Ab der anschließenden Zugabe von Photolyase bis zu einer Endkonzentration von 1 oder 4 ng·mL<sup>-1</sup> (Wildtyp) und 4 oder 16 ng·mL<sup>-1</sup> (R46E-Mutante) wurden für den weiteren Verlauf des Experiments strikte Sicherheitslichtbedingungen eingehalten. Die Photoreduktion der Photolyase erfolgte durch eine 15-minütige Bestrahlung mit Weißlicht (cutoff: 320 nm) bei einer Fluenzrate von 2500 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>. Nach der anschließenden Zugabe der T◊T-Dimer enthaltenden DNA-Lösung (Endkonzentration: 25 ng·mL<sup>-1</sup>) als Substrat für die Photolyase wurde eine Kontrollprobe entnommen und im Dunkeln aufbewahrt. Die Küvetten wurden unter ständigem Rühren photoreaktivierendem UV-A-Licht ( $\lambda_{\text{max}} = 370 \text{ nm}$ ) mit einer Fluenzrate von 10 W·m<sup>-2</sup> oder Blaulicht ( $\lambda_{\text{max}} = 447 \text{ nm}$ ) mit einer Fluenzrate von 9.8 W·m<sup>-2</sup> ausgesetzt. Für die Dauer von 30 min wurde alle 4 min eine 300 μL Probe entnommen und mit Phenol/Chloroform und Chloroform extrahiert. Je ein 50 μL Aliquot der wässrigen Phase wurde in eine Vertiefung einer 96-Well-ELISA-Platte (Microlon® 600, Greiner) pipettiert und die DNA bei einer Temperatur von 37 °C über Nacht gebunden.

Die Vertiefungen wurden fünfmal mit PBS-T-Puffer gewaschen und für 90 min bei 37 °C mit 3 % (w/v) BSA in PBS-Puffer geblockt. Anschließend wurde erneut fünfmal mit PBS-T-Puffer gewaschen und die Ansätze mit 50 μL des 1:1000 mit PBS-Puffer verdünnten, primären anti-Thymin-Dimer Antikörpers (KTM53, Kamiya Biomedical Company, Seattle, USA) inkubiert. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei 37 °C wurden fünf Waschschrte mit PBS-T-Puffer durchgeführt. Nachfolgend wurde der mit Meerrettichperoxidase konjugierte und 1:2000 mit PBS-Puffer verdünnte sekundäre  $\alpha$ -Maus-Antikörper appliziert und die Platten für dessen Bindung wiederum für 1 h bei 37 °C inkubiert. Zur Entfernung des überschüssigen sekundären Antikörpers wurden die Platten nach Inkubation dreimal mit PBS-T- und zweimal mit Citrat-Phosphat-Puffer gewaschen.

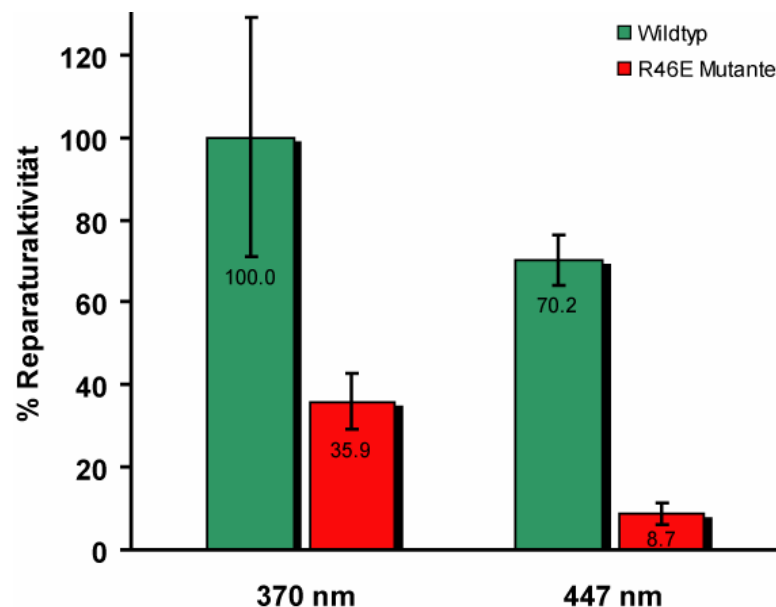
Daraufhin wurde die Peroxidasereaktion durch die Zugabe von 100 μL OPD–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung zu jedem Ansatz gestartet. Nach erfolgter Farbreaktion wurde die Umsetzung mit 50 μL Schwefelsäure (2 M) gestoppt und die Platten im ELISA-Reader bei 490 nm ausgelesen.

Um die Fehlerrate beim Auslesen einzelner Proben im ELISA-Reader zu minimieren, erfolgte eine doppelte Registrierung der Messwerte, aus denen im Anschluss ein Mittelwert gebildet wurde. Die erhaltenen Daten wurden um die Werte der Blindprobe ohne DNA und das Ergebnis der unbestrahlten Referenzprobe korrigiert.

Dem Ergebnis zufolge sind beide Enzyme in der Lage, unter dem Einfluss von UV-A-Strahlung bzw. Blaulicht geschädigte DNA zu reparieren (Abbildung 4.21).

Die höchste Reparaturaktivität für CPD-Schäden konnte bei der Bestrahlung nativer Photolyase mit UV-A-Licht verzeichnet werden. Die FMN-freie Mutante besitzt unter gleichen Bedingungen nur gut ein Drittel der Aktivität. Drastischer ausgeprägt ist der Unterschied, wenn nur Blaulicht für die Schadensreparatur zur Verfügung steht. Die Reparaturrate des Wildtyps sinkt bei diesen Maßgaben auf moderate 70 % im Vergleich mit der UV-A-Bestrahlung. Demgegenüber hat die Mutante jedoch mit nur knapp 9 % eine im direkten Vergleich zur Bestrahlung des Wildtyps mit dem kurzwelligen UV-A-Licht achtfach niedrigere Reaktivierungsfähigkeit für einen CPD-Schaden (Abbildung 4.21).

In Übereinstimmung mit durchgeführten HPLC-gestützten Aktivitätsstudien [Ueda, 2005] wurde FMN mittels obiger Ergebnisse als hocheffizientes energieübertragendes Antennenchromophor identifiziert [Saxena, 2005; Cheung, 1999; Kim, 1992].



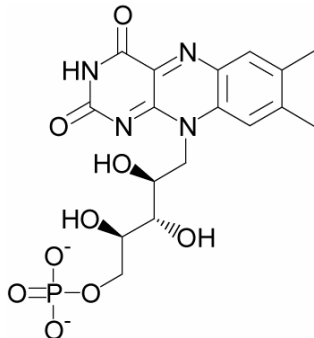
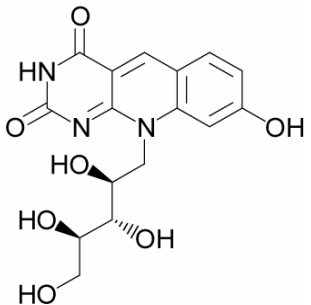
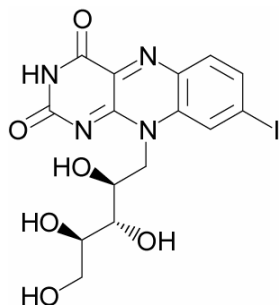
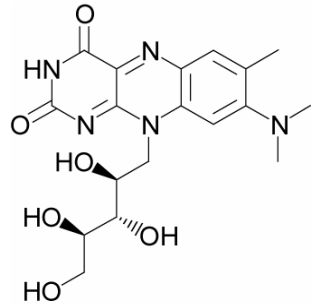
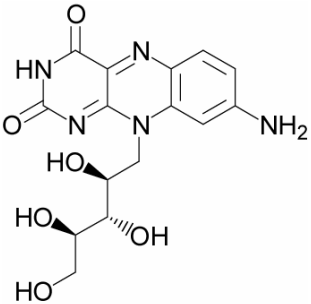
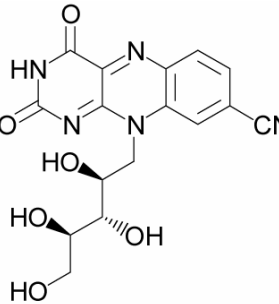
**Abbildung 4.21:** Reparaturaktivität von Wildtyp und R46E-Mutante der *T. thermophilus* Photolyase bei 370 nm und 447 nm. Die schwarzen Fehlerbalken geben die relative Standardabweichung an.

#### 4.4.7. Kristallisation der *T. thermophilus* Photolyase mit artifiziellen Flavinanaloga

Die für die Kristallisation mit *T. thermophilus* Photolyase eingesetzten artifiziellen Flavinanaloga 8-Iodoriboflavin, 8-Cyanoriboflavin und 8-Aminoriboflavin wurden von Ulrich

Hennecke (Ludwig-Maximilians-Universität, München) synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Das verwendete 8-HDF wurde von Alexandra Mees (Ludwig-Maximilians-Universität, München) nach publizierten Protokollen [Mees, 2005; Tanaka, 1988] synthetisiert und bereitgestellt.

Zunächst ausgeführte Kristallisationsscreens (*Hampton Crystal Screen*, *Hampton Crystal Screen Lite*) mit aufgereinigter Photolyase ( $c = 11.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) erfolgten nach der gängigen *hanging drop* Methode (siehe Kapitel 3.4.1) mit Tropfenvolumina von  $1 \mu\text{L}$  Protein- und  $1 \mu\text{L}$  Reservoirlösung sowie einem Reservoirvolumen von  $750 \mu\text{L}$ . Nach 4-6 Tagen zeigten sich erste, aus gebildetem Präzipitat gewachsene, kleinere grün-gelbe Kristalle in einer 1:1 mit bidestilliertem Wasser verdünnten Bedingung des *Hampton Classic Screen* bei einer Zusammensetzung von 50 mM Tris-HCl, pH = 8.5 und 1.0 M  $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ . Die daraufhin bei Variation der Salzkonzentration und des pH-Werts durchgeführte Optimierung lieferte sehr gut reproduzierbare, große und für die Röntgenstrukturanalyse geeignete Kristalle, wobei sich die Screenbedingung als bereits optimal erwies.

 <p>Flavinmononukleotid (FMN)</p>	 <p>8-Hydroxy-7,8-didemethyl-5-deazariboflavin (8-HDF)</p>	 <p>8-Iodo-7,8-didemethylriboflavin (8-IRF)</p>
 <p>8-Dimethylamino-8-demethylriboflavin (Roseoflavin)</p>	 <p>8-Amino-7,8-didemethylriboflavin (8-ARF)</p>	 <p>8-Cyano-7,8-didemethylriboflavin (8-CRF)</p>

**Tabelle 4.9:** Native und artifizielle Flavinanaloga, die für die Inkorporierung in *T. thermophilus* Photolyase verwendet wurden.

Um Kristalle mit verschiedenen, eingebetteten Antennencofaktoren zu erhalten, wurden 0.1 mM des entsprechenden Flavinanalogon (Konzentrationen von 1.9-5 mM) nach direkter Zugabe in den Kristallisationstropfen mit diesem inkubiert. Im Verlauf stellte sich dafür eine Zeit von etwa 90 min als optimal heraus, um die Bindungstasche vollständig mit dem gewünschten Flavin zu besetzen, ohne den Kristall zu schädigen.

Gesoakte Kristalle wurden in Kristallisationspuffer mit einer Zugabe von 30 % (v/v) Glycerin als Frostschutzzusatz stabilisiert und anschließend für Röntgenstrukturuntersuchungen in flüssigem Stickstoff weggefroren.

#### 4.4.8. Datensammlung und Strukturbestimmung

Die Datensammlung der *Thermus thermophilus* Photolyase Kristalle erfolgte an der eigenen Bruker-Nonius FR591 Drehanode sowie an der EMBL-Beamline BW7A des DORIS III Speicherrings am DESY in Hamburg bei einer Temperatur von 100 K. Die Wellenlänge der Kupfer-K $\alpha_1$ -Strahlung an der Drehanode betrug  $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ , die der verwendeten Synchrotronstrahlung lag bei  $\lambda = 0.8125 \text{ \AA}$ , fokussiert auf eine Größe von 2 mm x 0.4 mm.

Vollständige Datensätze von gefrorenen Einkristallen wurden bis zu Auflösungen von 1.95-2.6  $\text{\AA}$  gesammelt und die Daten anschließend mit den Programmen MOSFLM und SCALA [CCP4, 1994] prozessiert. Aufgrund der systematischen Absenzen konnte die hexagonale Raumgruppe P6 $_1$ 22 eindeutig zugewiesen werden. Im Allgemeinen wiesen die mit unterschiedlichen Cofaktoren gesoakten Kristalle eine höhere Auflösung als native Kristalle auf. Gleichfalls lag die Mosaizität dieser Kristalle in der Regel deutlich niedriger. Die erhaltenen Zellparameter betragen ( $a = b = 112.07 \text{ \AA}$ ,  $c = 140.54 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = 90^\circ$ ,  $\gamma = 120^\circ$ ) woraus ein Molekül pro asymmetrischer Einheitszelle entnommen werden kann.

Die Strukturlösung erfolgte durch *molecular replacement* (MOLREP) [Vagin, 1997] mit der bereits veröffentlichten Kristallstruktur von isomorphen Kristallen dieses Enzyms als Suchmodell (pdb-code: 1IQR) [Komori, 2001]. Die Strukturdaten aus diesem Modell wurden so modifiziert, dass sie keine Informationen mehr für den Cofaktor FAD oder Solvensmoleküle enthielten. Die daraus erhaltenen Daten dienten als Basisdatensatz für alle weiteren Strukturuntersuchungen und -verfeinerungen. Die MOLREP-Lösung für Daten von 20.0-2.8  $\text{\AA}$  lieferte einen linearen Korrelationskoeffizienten von 0.628 und einen R-Faktor von 40.4 %.

Datensammlung	FMN	8-HDF	8-IRF
Raumgruppe	P6 <sub>1</sub> 22	P6 <sub>1</sub> 22	P6 <sub>1</sub> 22
Auflösung (Å)	33.7-2.0	19.9-1.9	24.2-2.6
beobachtete Reflexionen	362052	258451	149169
einzigartige Reflexionen	35872	38938	15169
Mosaizität (°)	0.44	0.30	0.70
Wilson B-Faktor (Å <sup>2</sup> )	37.6	33.8	50.8
I/σ(I) <sup>a)</sup>	28.5 (3.1)	18.5 (2.4)	19.7 (4.0)
R <sub>merge</sub> <sup>b)</sup>	0.055 (0.520)	0.089 (0.534)	0.140 (0.461)
Vollständigkeit (%)	99.8 (99.9)	99.9 (99.9)	93.1 (98.5)
<b>Verfeinerungsstatistiken</b>			
Auflösung (Å)	19.9-2.0	18.9-1.95	24.2-2.6
Reflexionen (F>0σ), Testsatz	33863, 1776	36800, 1950	14393, 771
R-Faktor, R <sub>free</sub> <sup>c)</sup>	0.183, 0.225	0.169, 0.212	0.163, 0.256
Gesamtzahl der Atome	3665	3815	3572
Anzahl der Wassermoleküle	235	359	108
r.m.s.d. Bindungen (Å)	0.018	0.015	0.025
r.m.s.d. Winkel (°)	1.601	1.462	2.281
mittlerer B-Faktor (Å <sup>2</sup> )	45.7	44.4	26.4

**Tabelle 4.10:** Datensammlung und Verfeinerungsstatistik von Photolyase mit Flavinanalogia:

a) berechnet mit dem Programm TRUNCATE [CCP4, 1994]. b)  $R_{merge} = \frac{\sum \sum |I_j(h) - \langle I(h) \rangle|}{\sum \sum I_j(h)} \times 100$ ; die

Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale. c)  $R = \frac{\sum |F_{obs} - F_{calc}|}{\sum F_{obs}}$ ,  $R_{free}$  wurde mit 1.5 % der Daten berechnet.

Die weitere Verfeinerung erfolgte durch manuelles Einpassen der Struktur in die gemessene Elektronendichte mit dem Programm O [Jones, 1991], begleitet von wiederholten Verfeinerungszyklen mit Refmac5 [Murshudov, 1997]. Das resultierende fertige Modell des mit FMN rekonstituierten Enzyms enthält die von G2-D416 definierte Polypeptidkette, ein Molekül FAD sowie den Antennenchromophor, zwei Phosphationen, ein Chloridion und 235 Wassermoleküle (Tabelle 4.10). Nach Abschluss der Verfeinerung wurden R-Faktoren von R = 18.2 % und R<sub>free</sub> = 22.5 % für diese Struktur erhalten. Um die Kompatibilität der verschiedenen Datensätze von nativer und mit Cofaktoren gesoakter Photolyase zu gewährleisten, wurden alle Daten mit SCALEIT aufeinander skaliert [CCP4, 1994]. Aus im Vergleich zu nativer Photolyase berechneten Differenzelektronendichtekarten ließen sich



Rückschlüsse auf Veränderungen im Bindungsmodus und der Orientierung des Antennenchromophors als auch der umgebenden Aminosäuren ziehen.

## 5. Diskussion

### 5.1. Cokristallstruktur des Photolyase/DNA-Komplexes

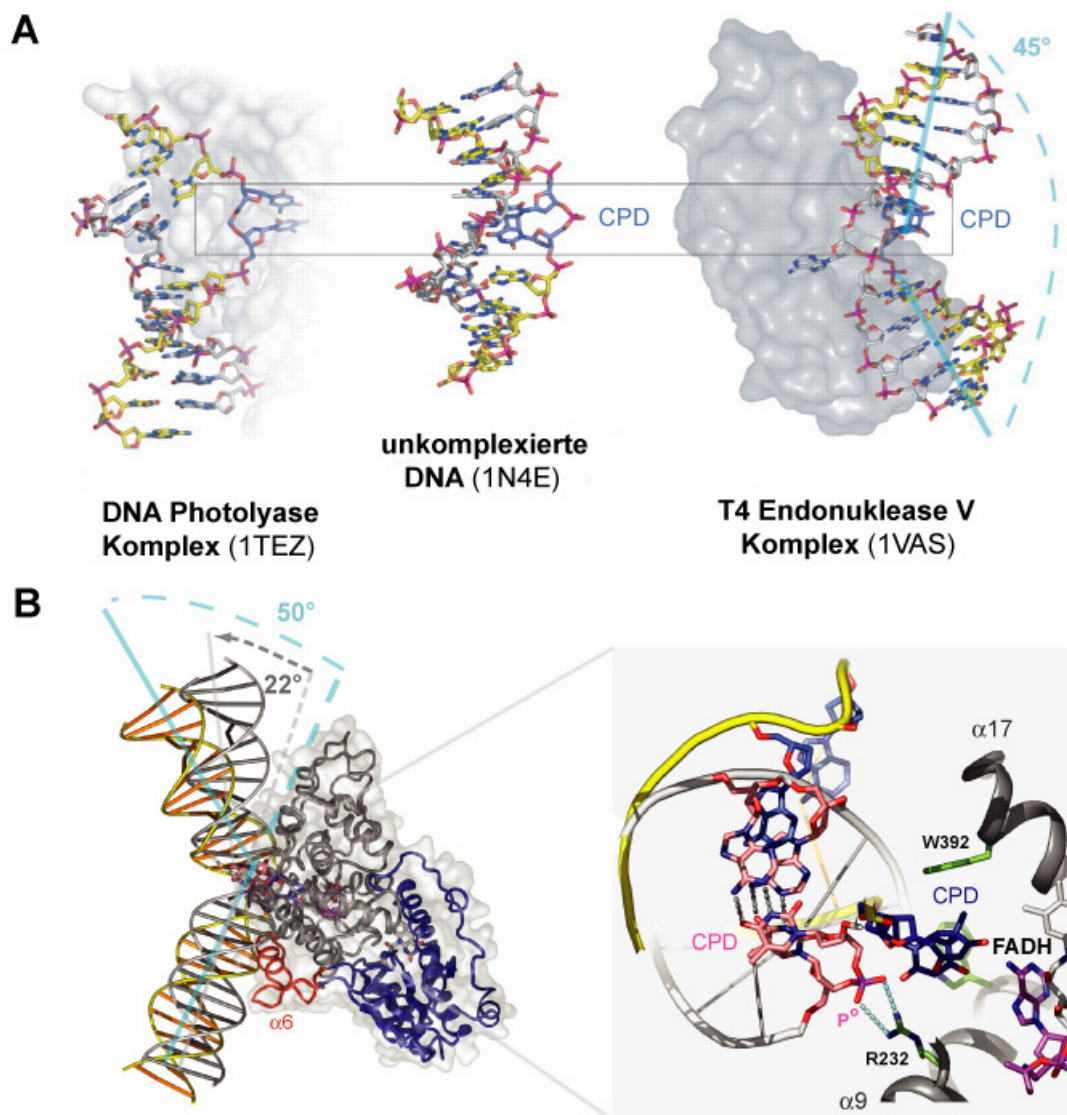
#### 5.1.1. Gesamtstruktur und DNA-Bindung der DNA-Photolyase

Die im Folgenden diskutierte Strukturanalyse bezieht sich, sofern nicht explizit darauf hingewiesen wird, auf Komplex A. Die beiden Komplexe A und B mit gebundener Duplex-DNA zeigen vielfältige Interaktionen des Proteins mit der DNA, die in den Bereichen außerhalb des Schadens eine übliche B-Konformation aufweist (Abbildung 5.1, A; Abbildung 5.2). Wie für ein sequenzunabhängiges DNA-Reparaturenzym nicht anders zu erwarten, sind alle auftretenden Wechselwirkungen mit der DNA ausschließlich auf ihr Phosphodesoxyribose-Rückgrat beschränkt. Der CPD-Schaden wird in der Bindungstasche spezifisch gebunden und vollständig aus der Ebene der Duplex-DNA herausgedreht (Abbildung 5.2). Die komplementären Adeninbasen des Gegenstrangs liegen weiterhin in der ursprünglichen Ebene und stapeln mit ihren Nachbarbasen. Aufgrund eines starken intrahelikalen Knicks im Bereich des CPD geschieht dies jedoch nicht untereinander.

Die Gegenüberstellung der Cokristallstruktur mit der unkomplexierten Photolyase weist mit einem r.m.s.d. von nur 0.583 Å für 473 C $\alpha$ -Atome erstaunlicherweise wenige Änderungen in der Gesamtstruktur auf. Einzig augenfällige Differenzen treten nur im Bereich der Kontaktregion von Protein und DNA auf, die mit etwa 1216 Å nur einen geringen Teil der gesamten Moleküloberfläche ausmacht und im Vergleich zu anderen DNA Reparaturenzymen deutlich kleiner ausfällt (Abbildung 5.1, A).

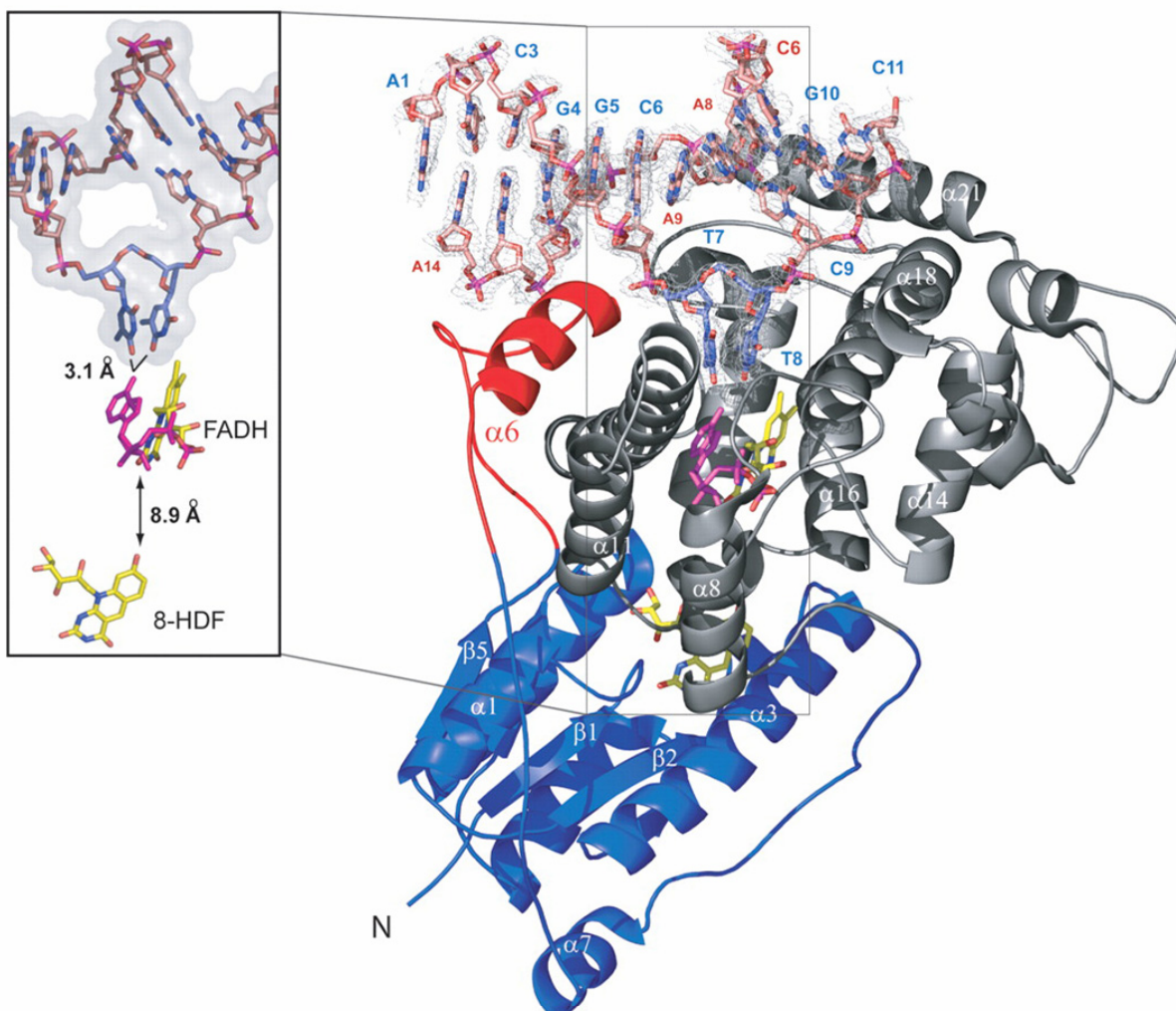
Die zur Bildung von CPD-Schäden führende Einwirkung von ultravioletter Strahlung auf B-DNA bewirkt bereits einen Knick von 20 bis 30 ° hin zur großen Furche, wie durch NMR-Untersuchungen und röntgenkristallographisch mit einem Dekamer nachgewiesen werden konnte (Abbildung 5.1, A Mitte) [Park, 2002; McAteer, 1998]. In AFM-Studien mit CPD-haltiger DNA, die mit *Anacystis nidulans* Photolyase komplexiert vorlag, wurden durchschnittliche Biegewinkel von 36 ° gemessen [van Noort, 1999]. Wie die vorliegenden Daten des DNA/Photolyase-Komplexes erkennen lassen, ist der Knick in der DNA hier auf zirka 50 ° erhöht (Abbildung 5.1, B). Der Photolyase/DNA-Komplex weicht infolgedessen signifikant von einem Komplex des ebenfalls DNA-reparierenden Enzyms T4 Endonuklease V aus der Klasse der Glycosylasen ab, das einen Knick von 45 ° der CPD-enthaltenden DNA

aufweist [Vassilyev, 1995]. Im Unterschied zum hier vorliegenden Komplex, wird dort ein Knicken der DNA in die entgegengesetzte Richtung beobachtet. Die Endonuklease dreht das dem 5'-Thymin der Duplex-DNA gegenüberliegende Adenin in sein aktives Zentrum und das Thymindimer verändert seine Stellung zur Helixachse nur unwesentlich (Abbildung 5.1, A rechts).



**Abbildung 5.1:** A) CPD-haltige Duplex-DNA gebunden an DNA-Photolyase (1TEZ) [Mees, 2004], T4 Endonuklease V (1VAS) [Vassilyev, 1995] oder unkomplexiert (1N4E) [Park, 2002]. B) Die Gesamtbiegung modellierter Duplex-DNA steigt von  $22^\circ$  (grau) auf etwa  $50^\circ$  bei Bindung an DNA-Photolyase (gelb). Abbildung nach [Mees, Klar, 2004].

Das Auseinanderreißen der Basenpaare in der katalytischen Umgebung führt zur Entstehung eines großen Lochs mit den Abmessungen von etwa 10 x 10 Å. Die vom Boden dieses Lochs herausragenden Aminosäuren G397-F406 bilden van-der-Waals Wechselwirkungen zwischen P402 und den Adeninen aus, die dem CPD-Schaden gegenüberliegen. Die einzige weitere Interaktion dieses kurzen, flexiblen Abschnitts ist die Bildung einer Wasserstoffbrücke des Amids von L403 zum P<sup>0</sup> Phosphat des CPD-freien Strangs. Auffallend ist die ungleiche Konformation in den nur einzelsträngige DNA ohne Gegenstrang bindenden Komplexen C und D, die der Konformation und den hohen B-Faktoren für diese kurze Sequenz gemäß dem Zustand im freien Enzym entspricht.

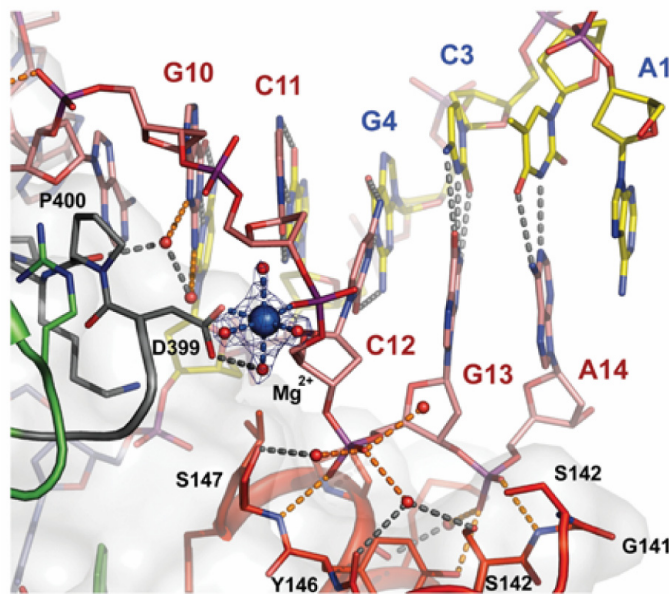


**Abbildung 5.2:** Bändermodell von Komplex A mit CPD-DNA (Stabmodell) und  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ -Dichte (konturiert bei  $1\sigma$ ). Das Thymindimer ist blau dargestellt (Bezeichnungen des CPD-Strangs: blau; Gegenstrang: rot). Abgesehen vom Adeninrest des FAD (pink), sind die Cofaktoren gelb gekennzeichnet. Abbildung nach [Mees, Klar, 2004].

Im Gegensatz dazu werden zahlreiche Salz- und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Protein sowie den Phosphaten  $P^{-1}$ ,  $P^{+1}$ ,  $P^{+2}$  und  $P^{+3}$  des DNA-Doppelstrangs ausgebildet (Abbildung 5.4). Obwohl das synthetische Dimer eine verbrückende Formacetalgruppe anstelle des Intradimer-Phosphats  $P^0$  enthält, können Wechselwirkungen mit diesem nahezu ausgeschlossen werden, da in der näheren Umgebung keine Aminosäuren auffindbar sind, die in der Lage wären, Salz- oder Wasserstoffbrücken aufzubauen. Diese Erkenntnis bestätigt die aus verschiedenen *footprinting* Experimenten an der *E. coli* und der *M. thermoautotrophicum* Photolyase abgeleitete allgemeine Erkennungssequenz  $NpT\Diamond TpNpNp$  für Photolyasen, ohne dass dabei eine Protein/DNA-Interaktion am Dimer-verbrückenden Phosphodiester  $P^0$  erfasst werden konnte [Kiener, 1989; Husain, 1987].

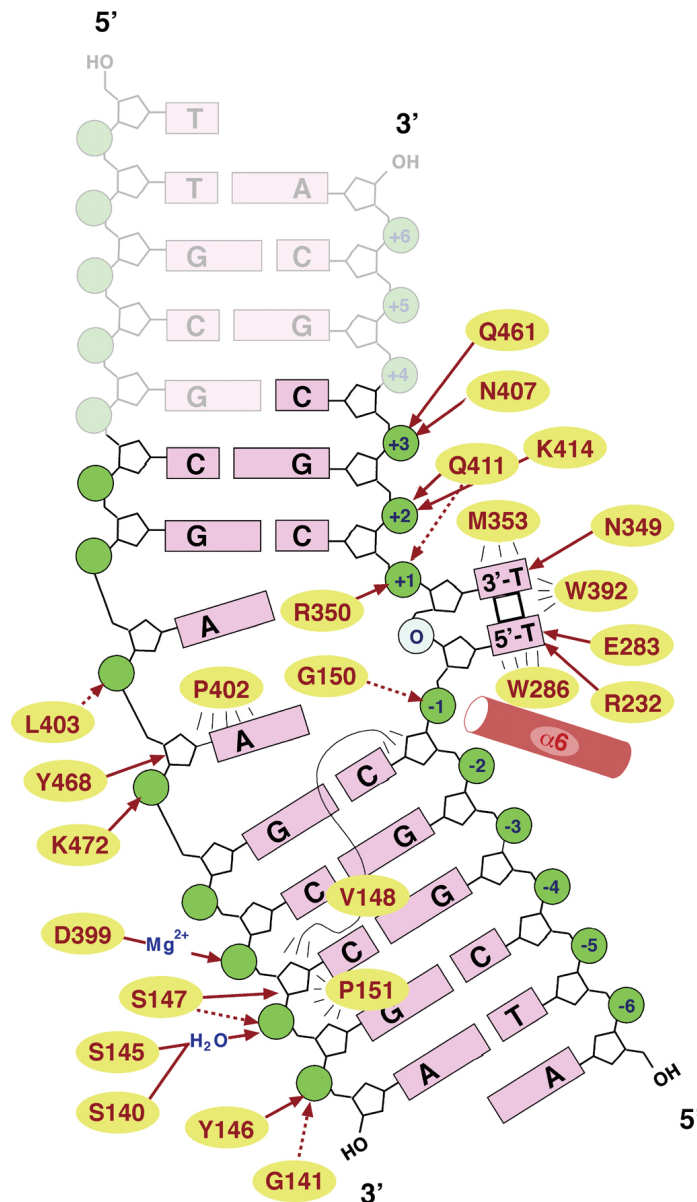
Die immens wichtige Rolle dieser Wechselwirkungen mit dem Phosphatrückgrat für die Bildung eines katalytisch kompetenten CPD-DNA/Photolyase-Komplexes wird durch Mutation von R350 belegt, das eine Salzbrücke zu  $P^{+1}$  ausbildet [Vande Berg, 1998]. Insbesondere Mutationen, die an den verschiedenen Aminosäuren des aktiven Zentrums durchgeführt wurden, führen zu den deutlichsten Einbußen der Photolyaseaktivität des Enzyms. Die Selektivität gegenüber der Schadenserkenung sinkt um den Faktor 32 und die Quantenausbeute der CPD-Spaltung fällt von ursprünglich 98 % auf etwa 60 % ab. Mutationsstudien an mit  $P^{+2}$  wechselwirkenden Aminosäuren (Q411, K414) haben nur eine mäßige Verringerung der Affinität gegenüber dem Substrat zur Folge [Vande Berg, 1998].

Das helikale Segment  $\alpha 6$  (V148-Q159) ragt in die kleine Furche am 5'-Ende des CPD-Schadens. Wie auch in anderen DNA-bindenden Proteinen nachgewiesen werden konnte, scheinen auch Photolyasen das Dipolmoment dieser Helix zur elektrostatischen Stabilisierung des Komplexes zu nutzen, indem dessen N-Terminus in Richtung des  $P^{-1}$  Phosphats dirigiert wird. Eine vergleichbare Interaktion lässt sich für die zum  $P^{+2}$  Phosphat gerichtete Helix  $\alpha 18$  (N407-T418) vermuten, die im Vergleich zur nicht komplexierten Photolyase um 0.6 Å verschoben ist. Der Ursprung der Helix  $\alpha 6$  (S140-G143) ist in der Antennendomäne lokalisiert, obwohl sie, anders als die restlichen Elemente der Domäne, nicht an der Bindung des Antennenchromophors 8-HDF beteiligt ist. Während der Bindung des Substrats verlagert sie sich um ca. 1.2 Å, um mit den Phosphaten  $P^{-4}$  und  $P^{-5}$  des Gegenstrangs, der kein CPD enthält, Wasserstoffbrücken auszubilden (Abbildung 5.3; Abbildung 5.4). In den Komplexen A und B wird diese Interaktion durch ein  $Mg^{2+}$ -Ion unterstützt, das die Verbrückung von  $P^{-3}$  und D399 vermittelt. Eine weitere, nicht konservierte Salzbrücke mit dem Gegenstrang wird zwischen  $P^{-1}$  und K472 ausgebildet (Abbildung 5.4).



**Abbildung 5.3:** Wechselwirkungen zwischen Gegenstrang und dem flexiblen Loop  $\alpha 6$  (grau) der Antennendomäne (rot) und dem verbrückenden Magnesiumion. H-Brücken mit der DNA sind orange, andere grau dargestellt.

Da die gemessenen Reparaturaktivitäten von DNA-Photolyasen in Bezug auf doppelsträngige und einzelsträngige DNA nur marginal variieren [Sancar, 2003], kann vermutet werden, dass die Interaktionen mit dem Gegenstrang die für die starke Biegung der DNA notwendige Bindungsenergie während der Bildung des Komplexes liefern.



**Abbildung 5.4:** Schematisches Diagramm der Interaktionen zwischen Duplex-DNA und Protein. Gepunktete Pfeile symbolisieren Wechselwirkungen mit dem Proteinrückgrat, durchgezogene Pfeile solche mit den Seitenketten. Die Nummerierung der Phosphatgruppen beginnt bei der Formacetalgruppe des Dimers (0). Abbildung nach [Mees, Klar, 2004].

### 5.1.2. Das gespaltene CPD in der katalytischen Bindungstasche

Die negative  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ -Differenzelektronendichte am Cyclobutanring zeigt eindeutig eine Spaltung der C5-C5- und C6-C6-Bindungen des synthetischen CPD-Schadens (Abbildung 5.5, B). In der aktiven Tasche ist aufgrund dieser Beobachtung das aus der Reparatur des



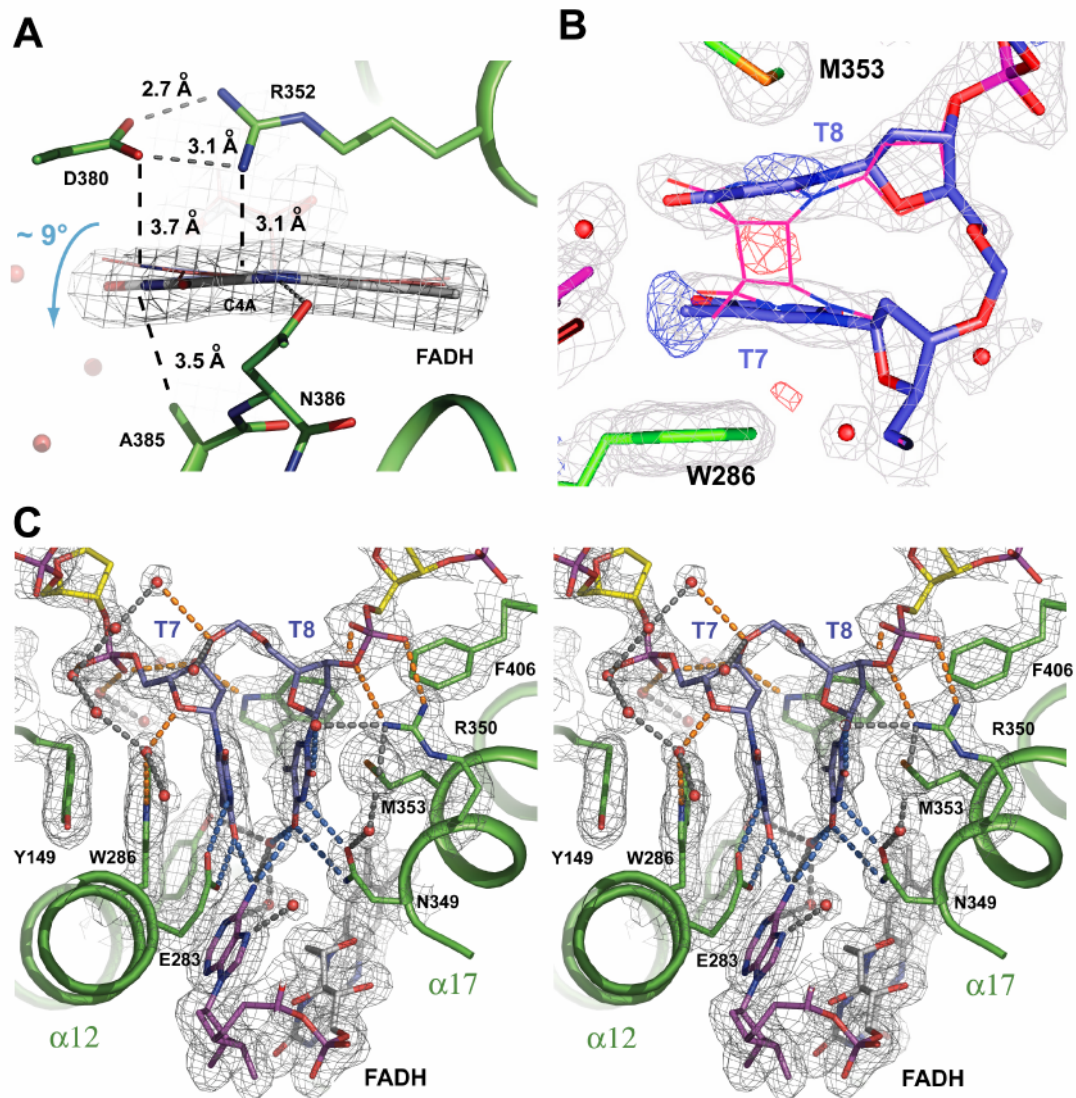
CPD-Schadens resultierende Thymin-Thymin-Dinukleotid gebunden.

Kapillarelektrophoretische Untersuchungen an Photolyase/DNA-Kristallen bestätigen, dass eine Spaltung des Thymin-Dimers nicht auftrat, sofern die Kristalle nur kurzzeitig ( $\approx 2$  Sekunden) oder gar nicht der ionisierenden Synchrotronstrahlung unterworfen waren. Es ist daher offensichtlich, dass die Cycloreversion des CPD-Schadens zu zwei einzelnen Thyminen während der Datensammlung und 600-1000 Sekunden anhaltenden Synchrotronstrahlung bei 100 K stattfand. Diese Feststellung steht einem früheren Bericht, die durch Blaulicht katalysierte [2+2]-Cycloreversion der Photolyasen könne nur bei einer Temperatur größer als 200 K stattfinden, diametral gegenüber [Langenbacher, 1997]. Über die Reparatur von CPD-Schäden bei 77 K, allerdings ohne entsprechendes Enzym, von durch Röntgenstrahlung generierten Elektronen sind ebenfalls Daten veröffentlicht worden [Pezeshk, 1996]. Die strukturellen Unterschiede des intermediären Thymin-Dinukleotids zum echten CPD-Schaden sind, von der Bindungsspaltung C5-C5 und C6-C6 abgesehen, nur gering. Die beiden entstandenen Pyrimidinringe des 5'-T und des 3'-T verbessern ihre wechselseitige Stapelung, indem der Neigungswinkel zwischen den Basenebenen von ursprünglich  $56^\circ$  auf  $16^\circ$  nach der Dimerspaltung vermindert wird [Park, 2002]. Es ist daher wahrscheinlich, dass alle hier festgestellten Interaktionen der DNA mit der Photolyase auch bereits vor der Spaltung des CPD-Schadens in ähnlicher Weise existieren.

Von dem beobachteten Thymin-Dinukleotid gehen zahlreiche Wechselwirkungen mit dem aktiven Zentrum des Enzyms aus, von denen insbesondere den Kontakten mit dem katalytischen Flavin  $\text{FADH}^\cdot$  eine entscheidende Bedeutung für die Beurteilung der stattfindenden Elektronentransferprozesse zukommt. Ein L-förmiger Keil aus den in Klasse I und (6-4)-Photolyasen konservierten Tryptophanen W286 und W392, steht in direkter van-der-Waals-Wechselwirkung mit der Ringebene des 5'-Thymins und einer Ecke des Thymin-Dinukleotids (Abbildung 5.4; Abbildung 5.5, B). Dieser hydrophobe Keil ist in der Lage, den Cyclobutanring während des Reaktionsverlaufs und der damit verbundenen Generierung der hochreaktiven Radikalanionspezies effektiv abzuschirmen. Demzufolge führen Mutationen an W392 zu einer drastischen Verringerung der Quantenausbeute und einer um 50 % verringerten Selektivität in Bezug auf den CPD-Schaden [Vande Berg, 1998]. Weiterhin bildet der Tryptophanring von W392 mit F406 eine hydrophobe Tasche entlang des aktiven Zentrums, die das Herausdrehen des CPD-Schadens aus der B-Typ Duplex-DNA unterstützen könnte. Beide C5-Methylgruppen der Thymine weisen in Richtung der beiden aromatischen Seitenketten von W286 und W392 und unterliegen aufgrund der nahezu coplanaren Anordnung zu W286, insbesondere beim 5'-Thymin, einer abstoßenden



Wechselwirkung. Es ist daher denkbar, dass diese sterische Orientierung für die beobachtete zwei- bis dreifach schnellere Elektronentransferrate von Uracil-Uracil- und Uracil-Thymin-Dimeren im Vergleich zu Thymin-Thymin- und Thymin\_Uracil-Dimeren verantwortlich ist [Butenandt, 2000; Langenbacher, 1997].



**Abbildung 5.5:** A) Um 9° gebogener Isoalloxazinrest des FADH in der katalytischen Region des DNA/Photolyase-Komplexes konturiert bei einer  $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ -Dichte von  $1\sigma$ . Der Rest des nicht mit DNA komplexierten Proteins (pdb-code: 1QNF) ist in hellrot dünn dargestellt. B) Modellierung des intakten CPD-Schadens im aktiven Zentrum (pink), die Differenzelektronendichte bei den Atomen C5 und C6 des Cyclobutanrings (rot:  $-3\sigma$ , blau:  $+3\sigma$ ) zeigt eindeutig die Spaltung des Dimers. Der reparierte Schaden ist mit der dazugehörigen  $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ -Dichte bei  $1\sigma$  grau dargestellt. C) Stereoabbildung der Wechselwirkungen des CPD-Schadens mit den Aminosäureresten im aktiven Zentrum. Abbildung nach [Mees, Klar, 2004].

### 5.1.3. Der katalytische Cofaktor und mögliche Elektronentransferwege

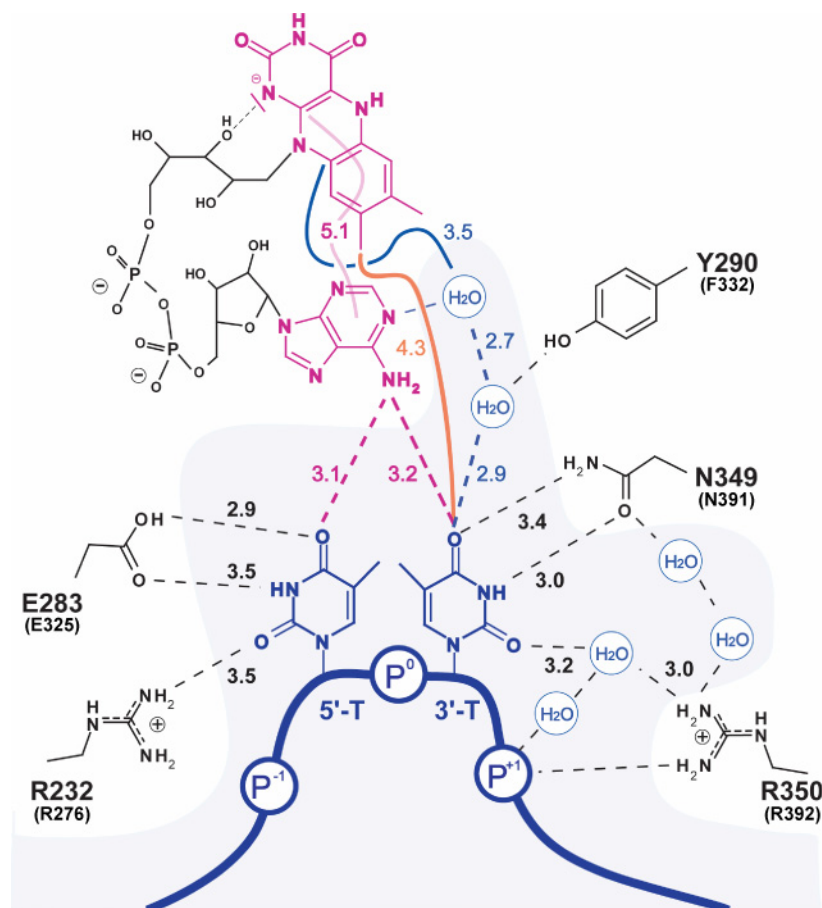
In allen bekannten CPD-Photolyasen und (6-4)-Photolyasen ist durchweg FAD der katalytisch aktive Cofaktor, der zunächst in einem als Photoaktivierung bezeichneten Prozess photochemisch zu  $\text{FADH}^\cdot$  reduziert wird. Die Kenntnis der von diesem Flavin zur geschädigten DNA ausgebildeten Kontakte ist wesentlich für das Verständnis von in Frage kommenden Elektronentransferwegen während der Photoreaktivierung des CPD-Schadens.

Abweichend von den bisher bekannten Photolyasestrukturen zeigt der Isoalloxazinrest des Enzyms in Gegenwart seines gebundenen Substrats eine auffällige *butterfly*-Verbiegung von  $9^\circ$  entlang seiner N5-N10-Achse (Abbildung 5.5, A). Zum einen könnte dies auf eine durch Synchrotronstrahlung hervorgerufene vollständige Reduktion des  $\text{FADH}^\cdot$  hinweisen, oder aber das Flavin liegt in der ursprünglich für die Kristallisation verwendeten radikalischen Semichinoidform vor, deren Verbiegung ebenfalls mit Hilfe von verschiedenen quantenchemischen Berechnungen vorhergesagt werden konnte [Weber, 2001; Zheng, 1996].

Die auffällige und allen strukturell untersuchten Photolyasen gemeinsame U-förmige Anordnung dieses Cofaktors, bei der der Isoalloxazin- und Adeninring über die Ribitylseitenkette in räumliche Nähe gebracht werden, lässt stark vermuten, dass ein indirekter Elektronentransfer vom Isoalloxazinrest über den Adeninring auf das mit 3.1 Å bzw. 3.2 Å nahezu gleich weit entfernte 5'-Thymin oder 3'-Thymin des Schadens erfolgen könnte (Abbildung 5.6, roter Weg). Deutliche Unterstützung erhält diese Möglichkeit durch die Ergebnisse einer theoretischen Studie, nach der der stattfindende Elektronentransfer in Photolyasen essentiell von der Distanz der Aminogruppe des Adenins zu der C4=O4-Carbonylgruppe und vollständig unabhängig von der Proteinumgebung ist [Antony, 2000]. Für diesen Verlaufsweg spricht weiterhin der aufgrund der Symmetrie hohe Überlappingsgrad der  $\pi$ -Systeme vom Isoalloxazinring mit dem Adeninrest [Medvedev, 2001; Weber, 2001]. Demnach findet die Elektronenübertragung vom Isoalloxazinring als  $\pi$ -Donorsystem über die 1'-CH und 2'-OH-Gruppen der Ribitylkette und den als ein Intermediat fungierenden Adeninring auf das Dimer statt.

Mit den aus der Struktur erhaltenen Daten ist jedoch auch ein direkter Elektronentransferweg nicht auszuschließen, der vom Isoalloxazinsystem auf die nur 4.3 Å von der C8-Methylgruppe entfernte C4=O4-Carbonylgruppe des 3'-Thymin führt (Abbildung 5.6, oranger Weg). Für diesen Weg würde auch sprechen, dass das Zentrum des  $\pi$ -Donorsystems nur 7 Å vom 3'-Thymin entfernt ist. Sofern die Photoreaktivierung auf diesem direkten Weg ablaufen würde, käme dem Adeninrest einzig die Bedeutung für die richtige Substraterkennung und

-orientierung durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu. Die Präferenz dieses Elektronentransferwegs konnte kürzlich durch Berechnungen der elektronischen Struktur der Anregungszustände von  $^*FADH^-$  bestätigt werden, da die hier beschriebene Struktur des Photolyase/CPD-DNA-Komplexes zugrunde lag [Prytkova, 2007]. Demnach ist ein Elektronentransfer auf den Adeninrest nahezu ausgeschlossen und der Tunnelmechanismus über die C8-Methylgruppe des  $^*FADH^-$  zum Dimer am wahrscheinlichsten, da die elektronische Kopplung zwischen dem proximalen Donorzustand des katalytischen Cofaktors und dem Akzeptorzustand des Dimers hauptsächlich durch die auf der proximalen Seite des Flavins lokalisierte Methylgruppe vermittelt wird.



**Abbildung 5.6:** Wechselwirkungen zwischen CPD-Schaden und Aminosäureresten der Bindungstasche (entsprechende Reste von *A. thaliana* Cryptochrom 3 sind in Klammern angegeben, siehe Kapitel 5.4.2). Mögliche Elektronentransferwege kommen über den Adeninrest des FAD (violett) oder über den Isoalloxazinring und das 3'-Thymin (orange) zustande. Abbildung nach [Mees, Klar, 2004].

Ultrakurzzeitspektroskopische Fluoreszenz- und Absorptionsmessungen lieferten ebenfalls keinen Hinweis auf eine intramolekulare Elektronenübertragung vom Isoalloxazinring auf den Adeninrest, so dass die Beteiligung des Adeninrests am Elektrontransferprozess nach gegenwärtigem Kenntnisstand sehr unwahrscheinlich ist [Kao, 2005]. Allein auf Grundlage der erhaltenen strukturellen Daten lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass eventuell beide Wege für den Elektronentransport Bedeutung besitzen. So könnte der direkte Weg für die Injektion des Elektrons auf den CPD-Schaden und der indirekte Weg für den Rücktransfer des überschüssigen Elektrons vom 5'-Thymin nach der Spaltung dienen.

### 5.1.4. Die CPD-Spaltungsreaktion

Die Beobachtung des reparierten CPD in der Bindungstasche lässt sich nahezu direkt mit einem intakten Thymin-Thymin-Dimer überlagern. Die stattgefundenene Cycloreversion verläuft demnach scheinbar ohne größere Orientierungsänderungen des CPD, wie dies bereits in theoretischen Studien dieser Reaktion vermutet wurde [Saettel, 2001; Rak, 1999]. Mit Hilfe von ultrakurzzeitspektroskopischen Untersuchungen an Komplexen von *Anacystis nidulans* Photolyase und CPD-haltiger DNA konnte eine in zwei Schritten ablaufende, Elektronen übertragende Reaktion nachgewiesen werden [MacFarlane IV, 2003]. Zunächst findet innerhalb der ersten 60 ps eine Elektronenübertragung auf den CPD-Schaden statt, gefolgt von der relativ langsamen Bindungsspaltung in den nächsten 1.5 ns. Die fast perfekte Quantenausbeute der Photolyasen von etwa 98 % wird vermutlich von dem Enzym durch die effektive Verhinderung des Elektronentransports vom CPD-Schaden auf das FADH<sup>•</sup>-Radikal erreicht, sofern die Spaltungsreaktion noch nicht zum Abschluss gekommen ist [Kim, 1992]. In einer weiteren Arbeit wurde der Elektronentransport in *E. coli* Photolyase durch Femtosekundenspektroskopie untersucht und der Radikalmechanismus des zweistufigen katalytischen Prozesses direkt nachgewiesen [Kao, 2005]. Zunächst findet innerhalb von 170 ps ein Elektronentransport vom angeregten \*FADH<sup>•</sup> auf den CPD-Schaden statt. Innerhalb der nächsten 560 ps wird das Dimer gespalten, das Elektron von den reparierten Thyminmonomeren direkt auf FADH<sup>•</sup> zurückübertragen und der katalytische Zyklus durch Regenerierung von FADH<sup>•</sup> geschlossen. Für den Schritt der Ladungstrennung und die Lebensdauer von \*FADH<sup>•</sup> im aktiven Zentrum wurde eine Quantenausbeute von 0.87 gemessen. Dies bedeutet, dass die Dimerspaltung mit einer Effizienz von nahe 100 % abläuft, da die bereits früher zu 0.89 bestimmte Quantenausbeute für die Gesamtreaktion in *E. coli*

Photolyase [Kim, 1991] sehr gut mit den Ergebnissen für den ersten Reaktionsschritt übereinstimmen.

Kinetische Studien belegen, dass die Bindungsspaltung am CPD-Radikal-Anion mit einer Aktivierungsenergie von etwa  $11 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion ist [Langenbacher, 1997].

Der Grund für die Bindung von CPD-Schäden einerseits und die Nichterkennung von zwei benachbarten intakten Pyrimidinen andererseits liegt offenbar in den zwischen Dimer und Enzym ausgebildeten neun Wasserstoffbrücken sowie weiteren hydrophoben Wechselwirkungen. Hinzu kommen räumlich begründete Abstoßungseffekte zwischen der Base des 3'-Thymins und der Seitenkette von M353. Weiterhin könnten durch den fehlenden Knick bei intakter DNA, Interaktionen des Phosphodiesterückgrats mit der CPD-Bindungsstelle nur durch höheren Energieaufwand für die Biegung realisiert werden.

#### 5.1.5. Konsequenzen für andere Photolyaseklassen

Klasse I und II CPD-Photolyasen, (6-4)-Photolyasen und Cryptochrome besitzen aufgrund des in allen drei Reichen des Lebens gefundenen Vorkommens einen gemeinsamen Ursprung, der den CPD-Photolyasen zuzurechnen ist [Kleine, 2003; Kanai, 1997]. Der Elektronentransportprozess und die Elektronenübertragung auf den DNA-Schaden über die Wasserstoffbrücke zwischen der Adeningruppe des  $\text{FADH}^-$ -Cofaktors und der C4-Carbonylgruppe des Pyrimidins sollten daher eine Gemeinsamkeit der Reparaturenzyme dieser Proteinfamilie darstellen. Der Erkennungsmodus des (6-4)Photoprodukts durch (6-4)-Photolyasen wird damit eingeschränkt. Das 5'-Thymin des Photoprodukts sollte ähnliche Wechselwirkungen mit dem Enzym eingehen wie das eines CPD-Schadens. In der (6-4)-Photolyase aus *Xenopus laevis* könnte das 3'-Thymin hingegen über eine Wasserstoffbrücke zu einem zu N349 korrespondierenden Histidin stabilisiert werden. Ein weiteres, dem Methioninrest M353 entsprechendes, in der aktiven Tasche lokalisiertes Histidin beeinflusst die Katalyse und könnte als Protonendonator mit dem 5'-Thymin wechselwirken [Hitomi, 2001]. Im vorliegenden Modell wäre die Orientierung dieses Restes nicht geeignet für eine Interaktion mit dem 5'-Thymin, könnte jedoch die bedeutende Funktion des R350 für die Ausbildung einer Salzbrücke zum  $\text{P}^{-1}$  Phosphat einnehmen. Dieser Rest ist in (6-4)-Photolyasen durch einen Leucinrest ausgetauscht. Die verschiedenen Abweichungen in der aktiven Tasche erfordern ein Feintuning der DNA-Konformation an der

Proteinoberfläche, um den strukturell unterschiedlichen (6-4)-Schaden akkurat binden zu können.

### 5.2. Reparatur von einzelsträngiger CPD-haltiger DNA in der Antennenregion von *Anacystis nidulans* DNA-Photolyase

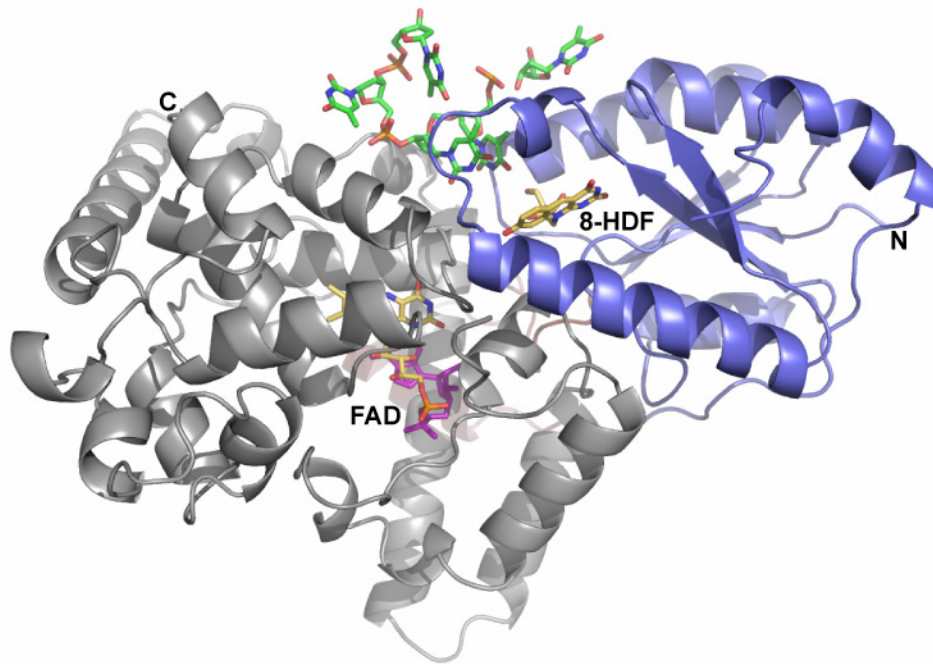
Die Cokristallisation von *A. nidulans* CPD-Photolyase mit dem einzelsträngigen Minimalschaden 5'-TpT $\diamond$ TpTpTp-3', der aus der Cokristallstruktur von *A. nidulans* Photolyase mit gebundener Duplex-DNA (siehe Kapitel 5.1.1) abgeleitet wurde, führte zu einem anfangs unerwarteten Ergebnis. Anstatt in der katalytischen Domäne unweit des für die Spaltung des CPD-Schadens verantwortlichen Cofaktors FAD zu binden, ist das DNA-Fragment in der Cokristallstruktur auf der gegenüberliegenden Seite des Enzyms in der Nähe des Antennencofaktors 8-HDF lokalisiert (Abbildung 5.7). In der bis dato veröffentlichten Literatur ist ausschließlich die Bindung von CPD-haltiger, meist doppelsträngiger DNA in einer dem katalytischen Cofaktor FAD nahen Bindungstasche nachgewiesen und berechnet worden. Eine zweite Bindungsstelle, die in der Lage ist, einzelsträngige DNA mitsamt dem für CPD-Photolyasen bekannten Substrat zu erkennen und zu reparieren, war bislang nicht vermutet worden. Ob diese Fähigkeit eine Besonderheit der *A. nidulans* Photolyase darstellt oder ebenfalls in weiteren CPD-Photolyasen beobachtet werden kann, müssen jedoch weitere Untersuchungen klären.

Die negative  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ -Differenzelektronendichte bestätigt eindeutig die Spaltung der C5-C5 und C6-C6-Bindungen des über eine Formacetalgruppe verbrückten, synthetischen CPD-Schadens. In der aktiven Tasche ist daher das aus der Reparatur der Läsion resultierende Thymin-Thymin-Dinukleotid gebunden [Essen, 2006a].

Aufgrund identischer Handhabung der vermessenen Kristalle, verglichen mit den Duplex-DNA enthaltenden Kristallen, kann auch hier davon ausgegangen werden, dass die CPD-Spaltung im Verlauf des Experiments durch den Einfluss von Synchrotronstrahlung und nicht bereits im Vorfeld erfolgte.

Der reparierte CPD-Schaden selbst ist, wie auch bei der Bindung der Doppelstrang-DNA zu beobachten ist, in das aktive Zentrum des Enzyms hereingedreht herausgedreht. Er befindet sich in unmittelbarer Nähe des Deazaflavins. Die C4=O4-Carbonylgruppe des 3'-Thymins besitzt mit einer Distanz von 4.5 Å zur 2'-OH-Gruppe der Ribitylseitenkette einen deutlich

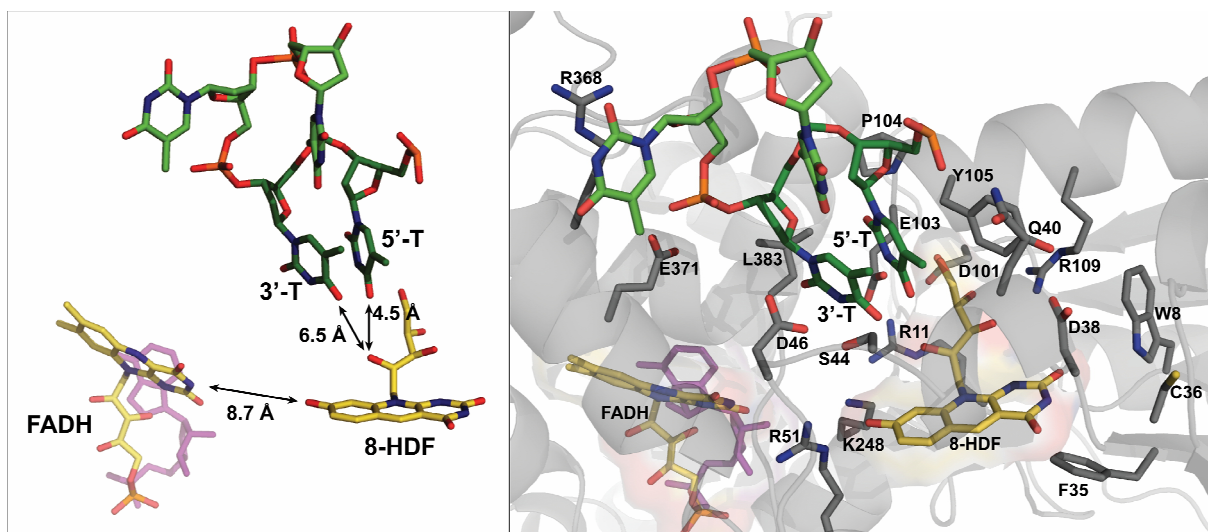
geringeren Abstand als die C4=O4-Carbonylgruppe des 5'-Thymins, das eine minimale Distanz von 6.5 Å für diese Interaktion aufweist (Abbildung 5.8). Die Abstände der C4=O4-Carbonylgruppen der beiden Thyminen zum O8 des Isoalloxazinsystems sind mit 6.8 Å bzw. 6.9 Å nahezu identisch.



**Abbildung 5.7:** Gesamtübersicht der Komplexstruktur von *A. nidulans* Photolyase mit repariertem, einzelsträngigem CPD-Schaden (grün) in der Antennenregion (blau) des Enzyms [Essen, 2006a]. Abgesehen vom Adeninrest (pink) in der FAD-bindenden Domäne (grau) sind die beiden Cofaktoren FAD und 8-HDF gelb gekennzeichnet.

Von dem Thymin-Thymin-Dinukleotid gehen zahlreiche Wechselwirkungen mit der Enzymumgebung aus, ohne dass eine Protein/DNA-Interaktion mit der Dimer-verbrückenden Formacetalgruppe feststellbar ist, da sich in der näheren Umgebung keine Aminosäurereste finden, die entsprechende Wasserstoffbrücken oder Salzbindungen aufbauen können. Diese Tatsache stimmt mit den Beobachtungen für das in der CPD-Bindungsregion in der Nähe des katalytisch aktiven FAD reparierten DNA-Schadens überein (siehe Kapitel 5.1.1). Die maßgeblichen Wechselwirkungen mit den beiden Thyminen kommen mit den Seitenketten von E103, D46 und S44 zustande. Für die genaue Positionierung in der Bindungstasche sind weiterhin die unpolare Reste I41, L383 sowie der Tyrosinrest Y105 bedeutend (Abbildung 5.8).



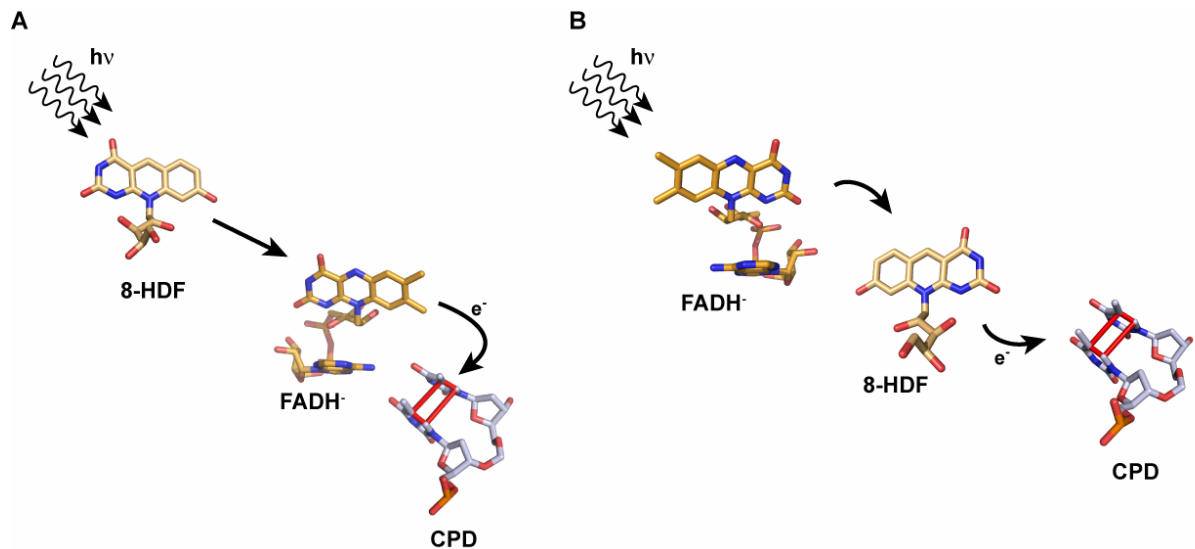


**Abbildung 5.8:** katalytisch aktive Antennenregion von *A. nidulans* Photolyase mit gebundenem und repariertem CPD-Schaden in einzelsträngiger DNA (grün). Wichtige Aminosäurereste sind grau, die beiden Flavincofaktoren (FAD, 8-HDF) gelb dargestellt.

Die Gemeinsamkeiten der beiden Strukturen mit gebundenem, repariertem Substrat lassen sich auch auf die Konformation des katalytischen Cofaktors FAD erweitern. Dessen Isoalloxazinrest weist in Gegenwart des am 8-HDF gebundenen Substrats ebenfalls eine auffällige *butterfly*-Verbiegung entlang seiner N5-N10-Achse auf, die mit  $9.5^\circ$  noch etwas größer ausfällt als bei gebundener Doppelstrang-DNA. Es ist daher nicht auszuschließen, dass eine vollständige Reduktion zum  $\text{FADH}^\cdot$  durch Elektronen zustande kam, die durch Synchrotronstrahlung injiziert wurden. Die Oxidationsstufe des Cofaktors ist jedoch nicht genau zu bestimmen, da eine Verbiegung um diesen Betrag auch für die halbreduzierte semichinoide Radikalform nachgewiesen wurde [Weber, 2001; Zheng, 1996].

Zusätzlich zu dem bei Photolyasen üblichen Elektronenübertragungsweg ist für *A. nidulans* Photolyase bei der Reparatur einzelsträngiger DNA aufgrund der hier beschriebenen Cokristallstruktur eine Alternative möglich. Nach der Absorption von Lichtenergie durch das in diesem Fall als Antennenchromophor fungierenden  $\text{FADH}^\cdot$  könnte eine Übertragung der Anregungsenergie auf das 8-HDF stattfinden. Durch die anschließende Übertragung eines Elektrons auf das CPD würde dieses gespalten und die beiden Thymine regeneriert (Abbildung 5.9).





**Abbildung 5.9:** üblicher und alternativer Elektronenübertragungsweg in *A. nidulans* Photolyase. **A)** Vom Antennencofaktor 8-HDF über das katalytisch aktive  $FADH^-$  auf den CPD-Schaden. **B)** Vom vollständig reduzierten  $FADH^-$  über den Antennencofaktor 8-HDF auf den CPD-Schaden.

### 5.3. Kristallstruktur von *A. thaliana* Cryptochrom 3

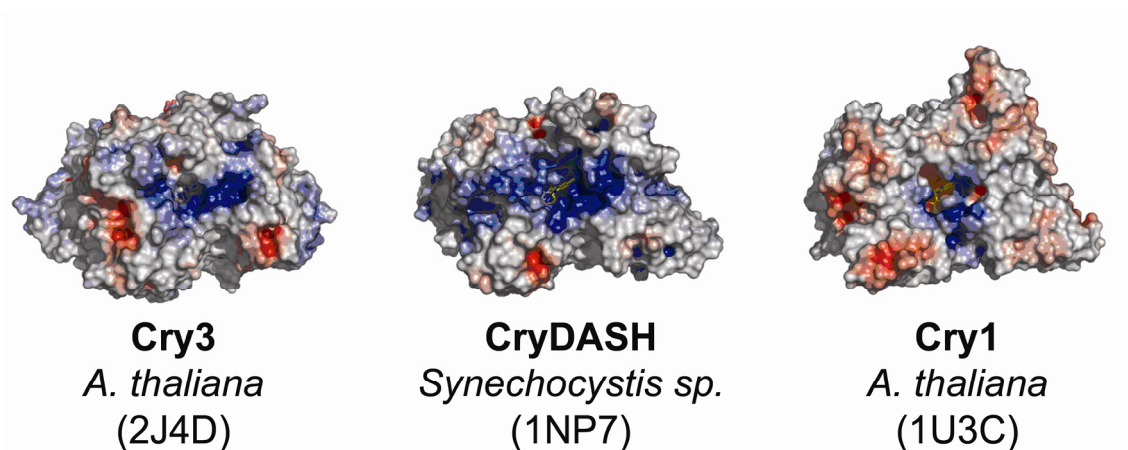
#### 5.3.1. Gesamtstruktur

Anders als bisher strukturell charakterisierte Cryptochrome weist die *A. thaliana* Cry3 Struktur nicht nur die beiden üblichen photolyaseähnlichen Domänen auf. Neben der den Antennencofaktor enthaltenden N-terminalen  $\alpha/\beta$ -Domäne (V41-R244) und der das katalytische FAD bindenden C-terminalen  $\alpha$ -helikalen Domäne (G245-H496) findet sich eine auch in verschiedenen pflanzlichen Cryptochromen des DASH-Typs vorkommende N-terminale Verlängerung (D2-G40). Sie reicht mit ihrem N-terminalen Teil fast vollständig auf die Oberfläche der C-terminalen katalytischen Domäne (Abbildung 4.7). Der C-Terminus ist in beiden Cry3 Molekülen der asymmetrischen Einheitszelle nicht als Elektronendichte definiert. In Molekül A fehlen die Reste G497-P526, in Molekül B lässt sich die erhaltene Dichte bis P500 einpassen. Die Aminosäuresequenz dieses Abschnitts enthält neben 10 Glycinen überwiegend polare Seitenketten und liegt wahrscheinlich deshalb in der Struktur ungeordnet vor.

In der Struktur bilden beide Moleküle ein Dimer aus, das über eine senkrecht zu den Cofaktoren MTHF und FAD verlaufende, zweifache nichtkristallographische Symmetrieachse

miteinander verbunden ist. Die polare Kontaktfläche des Dimers schließt etwa  $706 \text{ \AA}^2$  (ca. 3.2 % der Gesamtoberfläche) jedes Monomers von umgebendem Lösungsmittel aus. Wechselwirkungen der beiden Proteinketten bestehen vor allem zwischen verschiedenen Seitenketten von Helix  $\alpha 4$  (S147-V163) und dem Loop der Hauptkette, der das  $\beta 5$ -Faltblatt und die Helix  $\alpha 5$  (D181-V163) verbindet. Weiterhin ist das Antennenchromophor MTHF mit der Ausbildung von zwei Wasserstoffbrückenbindungen und einer Salzbrücke an der Dimerbildung beteiligt. Wesentlich sind hier dessen Bindungen zwischen dem Ende der Glutamygruppe mit D189, D192 und K338 des anderen Cry3 Monomers. In Lösung verhält sich das Protein bei Gelfiltrationsexperimenten hauptsächlich als Monomer, so dass davon ausgegangen werden kann, dass das kristallographisch beobachtete Dimer keinem *in vivo* relevanten Zustand entspricht.

Analog zu den Strukturen von *Synechocystis sp.* cryDASH und den verschiedenen Photolyasen sind bei *A. thaliana* Cry3 ebenfalls mehrere basische Aminosäurereste (R198, K273, R276, R392, R443, R446) um die katalytische Bindungsstelle in der Nähe des FAD angeordnet (Abbildung 5.10).



**Abbildung 5.10:** Vergleich der elektrostatischen Oberflächen in den FAD-Bindungsregionen von *Arabidopsis thaliana* Cry1 (pdb-code: 1U3C) und Cry3 (pdb-code: 2J4D) sowie *Synechocystis sp.* CryDASH (pdb-code: 1NP7), berechnet mit dem Programm APBS [Baker, 2001] bei einer Ionenstärke von 0.1 M (blau:  $-7 \text{ kcal} \cdot \text{e}^{-1}$ , weiß:  $0 \text{ kcal} \cdot \text{e}^{-1}$ , rot:  $+7 \text{ kcal} \cdot \text{e}^{-1}$ , 0.1 M Salz). Abbildung nach [Klar, 2007].

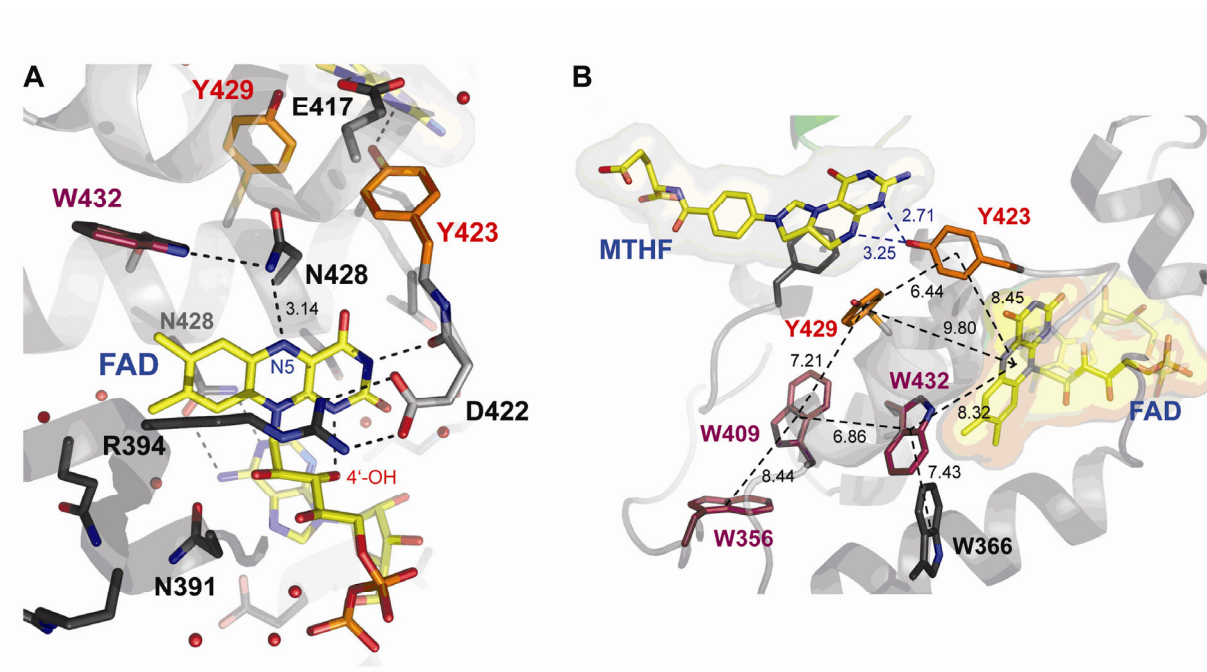
Eine mikromolare Bindungsaktivität für Einzel- und Doppelstrang-DNA konnte bereits für

CryDASH aus *Synechocystis sp.* [Brudler, 2003] und *Arabidopsis thaliana* [Kleine, 2003] durch Gelshiftassays nachgewiesen werden. Es ist daher davon auszugehen, dass der Modus der unspezifischen DNA-Bindung ähnlich zu dem der *Anacystis nidulans* Photolyase ist [Mees, 2004]. Bisher konnte jedoch noch kein Nachweis für die physiologische Relevanz der DNA-Bindung in Cryptochromen des DASH-Typs erbracht werden. Es ist daher ebenso möglich, dass diese Eigenschaft auf eine enge evolutive Verwandtschaft der sogenannten DASH-Cryptochrome zu den Klasse I DNA-Photolyasen zurückzuführen ist.

### 5.3.2. Intramolekulare Elektronentransferwege in Cryptochrom 3

Die Oberfläche des Cryptochrom 3 ist so beschaffen, dass FAD innerhalb einer Vertiefung in der Mitte der helikalen C-terminalen Domäne lokalisiert ist und von außen über ein Loch zugänglich ist. Die FAD Bindungsregion wird zum größten Teil von 12 innerhalb der DASH-Cryptochrome konservierten Resten gebildet. Die strukturelle Anordnung im Bereich der DNA-Bindungsstelle lässt vermuten, dass der Erkennungsmechanismus für den CPD-Schaden ebenfalls, wie bereits bei den Klasse I Photolyasen gezeigt, über ein aus der Ebene herausgedrehtes Dimer erfolgt (siehe Kapitel 5.1.2ff und 5.4.2ff).

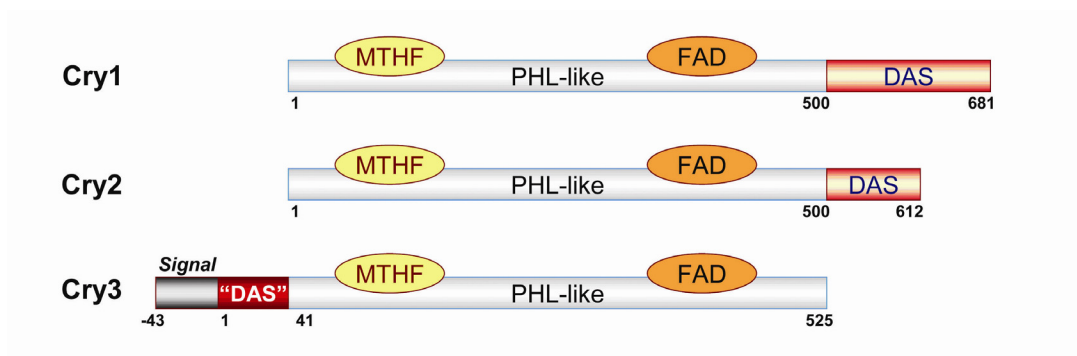
*A. thaliana* Cryptochrom 3 besitzt die gleiche von der Proteinoberfläche über drei konservierte Tryptophane zum FAD führende Elektronentransferkette (W356→W409→W432→FAD) wie *Synechocystis sp.* CryDASH (W320→W373→W396→FAD) [Brudler, 2003] oder auch die Photolyase aus *E. coli* (W306→W359→W382→FAD) [Park, 1995]. Ein alternativ möglicher Elektronentransferweg könnte über die beiden Tyrosine Y423 und Y429 verlaufen, da diese ebenfalls in einer dafür notwendigen Nähe zum Isoalloxazinring des FAD liegen und Y423 zwei Wasserstoffbrücken mit N1 und N8 des MTHF ausbilden kann (Abbildung 5.11, Abbildung 5.15 A, B). Diese Reste sind jedoch nur in DASH-Cryptochromen konserviert. Photolyasen und andere Cryptochrome besitzen an diesen Positionen durchweg nicht-aromatische Aminosäuren.



**Abbildung 5.11:** FAD-Bindung und mögliche Elektronentransferwege in *A. thaliana* Cry3. An konservierten Elektronentransferwegen beteiligte Reste sind violett, die an einem alternativen Weg beteiligten Tyrosine sind rot markiert. Abbildung nach [Klar, 2007].

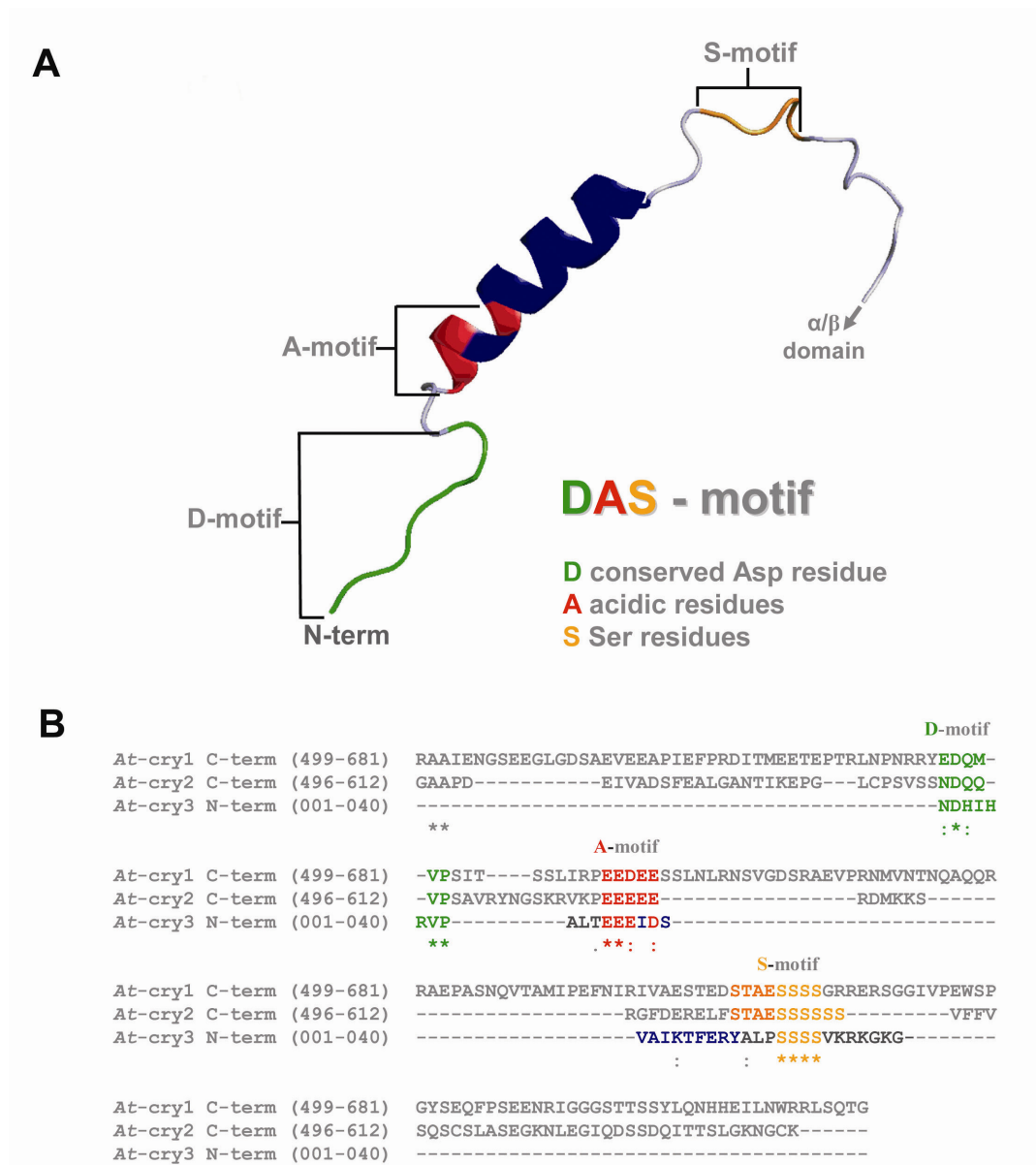
### 5.3.3. Die N-terminale Verlängerung

Die N-terminale Verlängerung N1-G40 beginnt in der  $\alpha/\beta$ -Antennendomäne und zieht sich entlang der Oberfläche der katalytischen Domäne bis auf deren Rückseite. Im vollständigen Cryptochrom 3 ist dem so genannten DAS-Motiv eine für den Transport in Mitochondrien und Chloroplasten zuständige, 43 Aminosäuren lange Signalsequenz vorangestellt, die dem hier kristallisierten Protein fehlt. Dieser Teil des N-Terminus ist eine Besonderheit der pflanzlichen DASH-Cryptochrome. Obwohl diese Verlängerung in Cry3 wesentlich kürzer ausgeprägt ist als die bei Cry1 (181 aa) und Cry2 (112 aa) C-terminal angeordneten, ist das Gesamtmotiv dennoch miteinander vergleichbar [Lin, 2003].



**Abbildung 5.12:** N-terminale und C-terminale Verlängerungen von *Arabidopsis thaliana* Cry1, Cry2 und Cry3. Abbildung nach [Klar, 2007].

Das D-Motiv in Cry3 beginnt mit einem Aspartatrest (DHIHVP), der vom A-Motiv saurer Reste (EEEID) abgelöst wird. Das Ende des Gesamtmotivs bildet die serinreiche Sequenz (SSSS) des S-Motivs. Ob und welche Rolle dem DAS-Motiv für die lichtabhängige Signalkaskade zukommt, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden, da sie zwar homolog zu den C-Termini bei Cry1 und Cry2 aus *A. thaliana* ist, aber nicht bei allen pflanzlichen DASH-Cryptochromen konserviert ist. Cryptochrome aus Tomate und Reis zeigen beispielsweise keine oder nur eine geringe Konservierung dieser auffälligen Sequenzabfolgen.



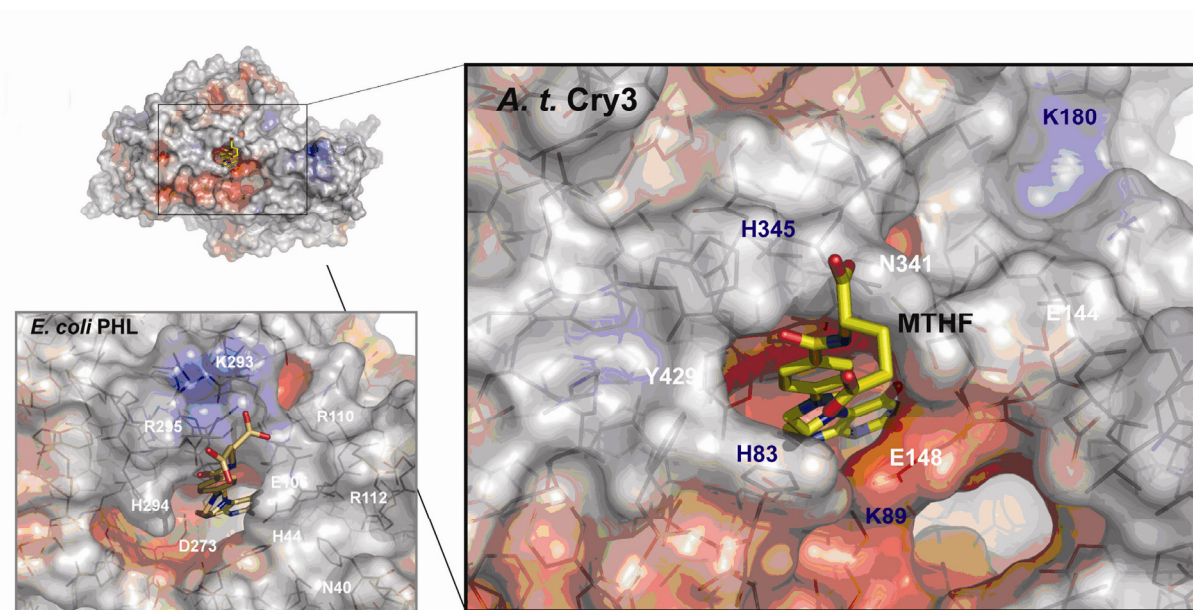
**Abbildung 5.13:** A) Struktur des DAS-Motivs aus *A. thaliana* Cry3. B) Sequenzalignment der DAS-Motive. Abbildung nach [Klar, 2007].

#### 5.3.4. Die Antennenchromophor-Bindungsstelle

Der Antennencofaktor MTHF ist teilweise in einer Spalte zwischen N-terminaler und C-terminaler Domäne im Bereich der Kontaktregion gebunden. Dadurch wird der Austausch von eingeschlossenem Wasser mit umgebendem Lösungsmittel wirksam unterbunden. Diese Art der Chromophorbindung ist strukturell eng verwandt mit der Anordnung des MTHF in *E. coli* Photolyase [Park, 1995]. Ein Unterschied liegt in der mit 15.2 Å (*E. coli*: 16.7 Å) etwas verringerten Distanz zum zweiten Chromophor FAD. Die Orientierung der



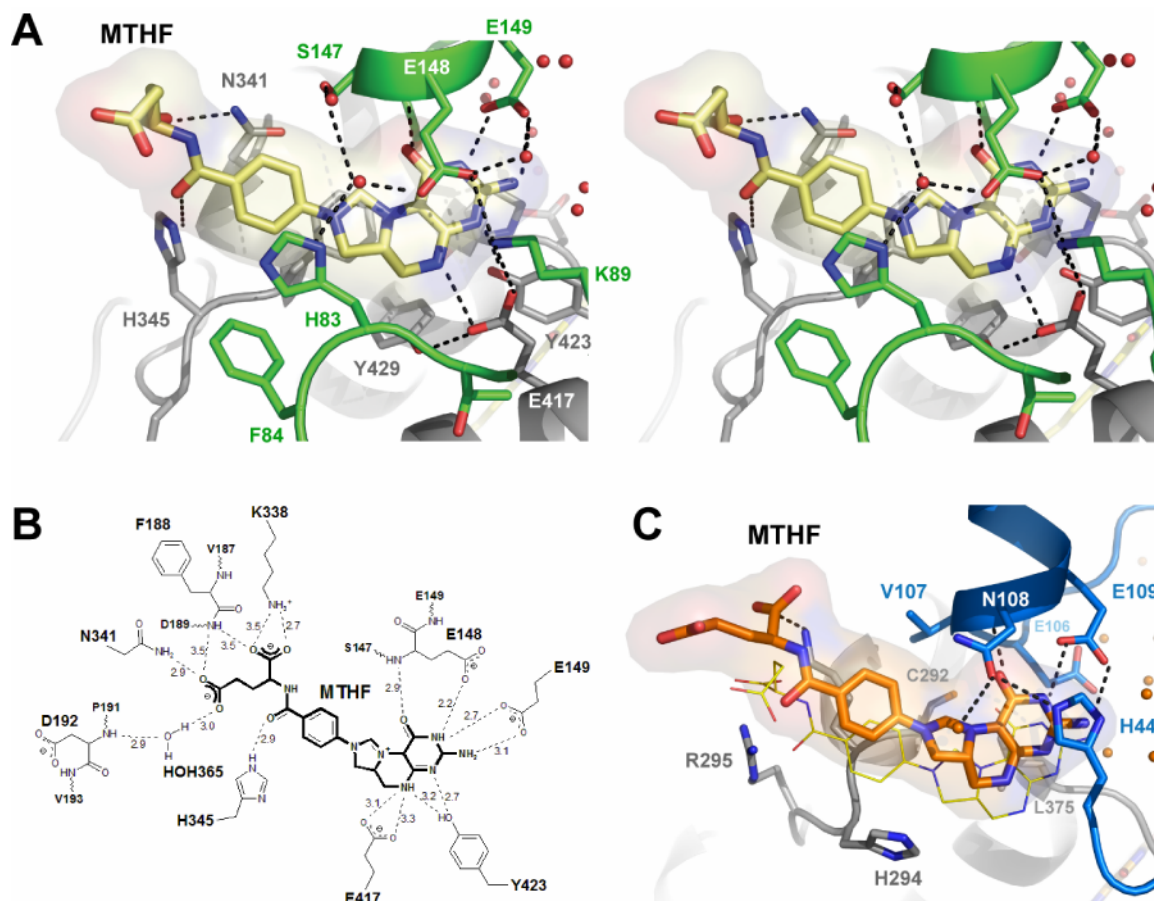
aromatischen Ringebenen der beiden Cofaktoren zueinander ist in beiden Enzymen ebenfalls vergleichbar. Die geringere Distanz bei Cry3 könnte den mit Hilfe von laserspektroskopischen Experimenten ermittelten, schnellen Energietransfer zwischen MTHF und FAD mit Quantenausbeuten von bis zu 80 % für einen dunkel-adaptierten und 90 % für einen licht-adaptierten Zustand erklären [Song, 2006]. Für das dem *A. thaliana* Cry3 verwandte DASH-Cryptochrom aus *Vibrio cholerae* wird ebenfalls eine verkürzte Distanz von MTHF zu FAD angenommen, da dieses im Vergleich zu *E. coli* Photolyase einen um den Faktor vier schnelleren Energietransfer aufweist [Saxena, 2005].



**Abbildung 5.14:** Elektrostatische Oberflächendarstellung der MTHF-Bindungsregionen von *A. thaliana* Cry3 bzw. *E. coli* Photolyase, berechnet mit dem Programm APBS [Baker, 2001] bei einer Ionenstärke von 0.1 M (blau:  $-7 \text{ kcal}\cdot\text{e}^{-1}$ , weiß:  $0 \text{ kcal}\cdot\text{e}^{-1}$ , rot:  $+7 \text{ kcal}\cdot\text{e}^{-1}$ ). Abbildung nach [Klar, 2007].

Die in der MTHF Bindungsregion vorhandenen Aminosäuren sind innerhalb der DASH-Cryptochrome stark konserviert, obwohl diese Cryptochrome in einer Vielzahl von unterschiedlichsten Organismen vorkommen. Der direkte Sequenz- und Strukturvergleich von Cryptochrom 3 mit *E. coli* Photolyase zeigt jedoch deutliche Differenzen innerhalb dieser bedeutenden Region. Sind bei Cry3 noch 12 Aminosäurereste an der Bindung zum Antennenchromophor beteiligt, so sind in *E. coli* Photolyase nur 8 Reste beteiligt. Der einzige in beiden Enzymen konservierte Rest ist E149 (*E. coli*: E168). Die Bedeutung dieser

Konservierung ist durch Mutationsstudien an der *E. coli* Photolyase belegt worden, die zeigen, dass nur diese Aminosäure im Wesentlichen für die Bindung und Absorptionscharakteristik von MTHF in der Photolyase verantwortlich ist [Henry, 2004]. In beiden Proteinen bildet E149 zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit dem N3 und der C2-Aminogruppe des Pterinrings aus (Abbildung 5.15). Der Grund für die im Vergleich insgesamt größere Anzahl an Wechselwirkungen des Cry3 mit seiner Proteinumgebung ist der um die Aminosäuren H83-T90 verlängerte und Teile der MTHF-Bindungsregion ausbildende Loop  $\beta 2$ - $\alpha 2$ . Diese Verlängerung ist in allen weiteren Cryptochromen des DASH-Typs konserviert, fehlt jedoch in der *E. coli* Photolyase.



**Abbildung 5.15:** A) Stereoabbildung der MTHF-Bindung in *A. thaliana* Cry3. B) Schema der Wechselwirkungen von MTHF mit der Cry3 Proteinumgebung. C) Wechselwirkungen der MTHF-Bindung in *E. coli* Photolyase. Abbildung nach [Klar, 2007].



### 5.3.5. Spektroskopische Charakterisierung von Wildtyp und E149A Mutante

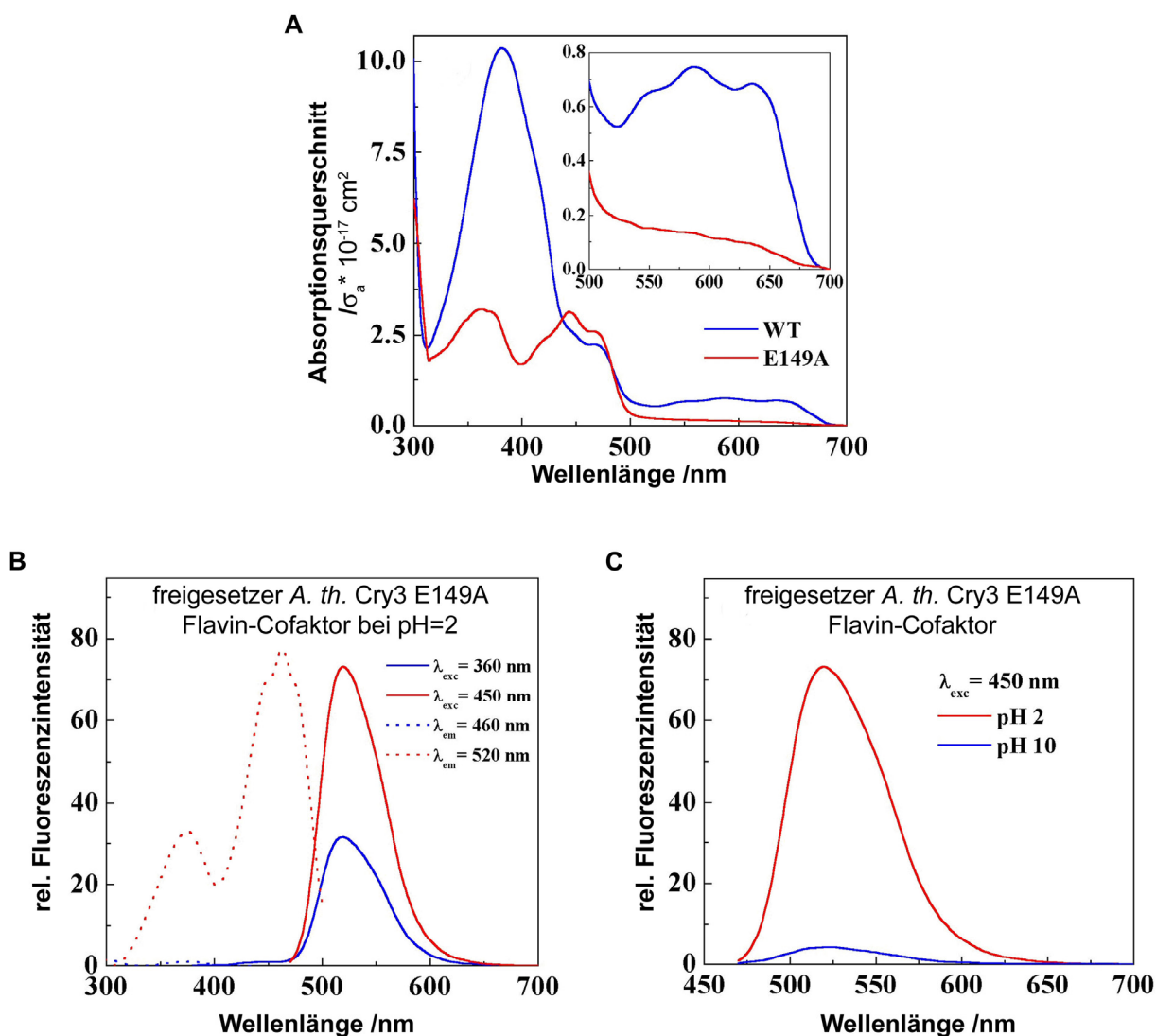
In Kooperation mit Julia Moldt und Dr. Richard Pokorny (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Alfred Batschauer, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg) wurden verschiedene spektroskopische Untersuchungen am Wildtyp des auch für die Kristallisation eingesetzten *A. thaliana* Cryptochrom 3 und der mittels ortsspezifischer Mutagenese hergestellten Mutante E149A durchgeführt.

Der Vergleich der von *A. thaliana* Cry3 Wildtyp und E149A-Mutante aufgenommenen Absorptionsspektren zeigt bei der Mutante eine starke Abnahme des für proteingebundenes MTHF typischen Absorptionsmaximums bei 380 nm [Song, 2006]. Weiterhin ist eine deutliche Verringerung der Absorptionsbanden im Bereich von 530 nm bis 700 nm zu verzeichnen, der charakteristisch für semichinoide Flavinspezies ist. Das von der Mutante erhaltene Absorptionsspektrum mit Maxima bei 365 nm und 450 nm mit ausgeprägten Schultern bei 430 nm und 470 nm zeigt, dass in der Mutante der FAD-Cofaktor ausschließlich oxidiert vorliegt (Abbildung 5.16, A).

Um den Verlust des MTHF in Cry3-E149A eindeutig nachzuweisen, wurden nach TCA-Fällung des Proteins im Folgenden verschiedene Fluoreszenzexperimente ausgeführt. MTHF sollte nach Anregung ein typisches Emissionsspektrum bei 440-460 nm aufweisen. Die gemessenen Emissionsspektren an den von Cry3-E149A freigesetzten Cofaktoren zeigen jedoch kein dem MTHF zuzuordnendes Absorptionsmaximum bei 360 nm (Abbildung 5.16, B). Das Anregungsspektrum für eine Emission bei 520 nm weist die für vollständig oxidiertes FAD typischen Maxima bei 360 nm und 450 nm auf. Die Anregung bei diesen beiden Wellenlängen resultierte einzig in einem für Flavine zu erwartenden Maximum bei 520 nm. Die verschiedenen Spektren belegen zweifelsfrei das Fehlen des Antennenchromophors MHTF und die alleinige Anwesenheit des Flavins als katalytischen Cofaktor in der Cry3-E149A-Mutante.

Eine endgültige Unterscheidung zwischen verschiedenen möglichen Formen des Flavins (FAD, FMN oder Riboflavin) war durch Messung von Emissionsspektren bei verschiedenen pH-Werten möglich [Weber, 1950]. Während FAD bei pH-Werten von 4-5 und darunter einen starken reversiblen Fluoreszenzanstieg aufweist, sinkt die Fluoreszenzrate von Riboflavin bei diesen Protonenkonzentrationen bereits rapide ab. Die Cry3-E149A-Mutante enthält demnach wie auch der Wildtyp des Proteins FAD als katalytischen Cofaktor (Abbildung 5.16, C). Durch HPLC-Analyse konnte dieses Ergebnis bestätigt und die Stöchiometrie der FAD-Bindung an das Enzym mit 1:1 bestimmt werden. Das native

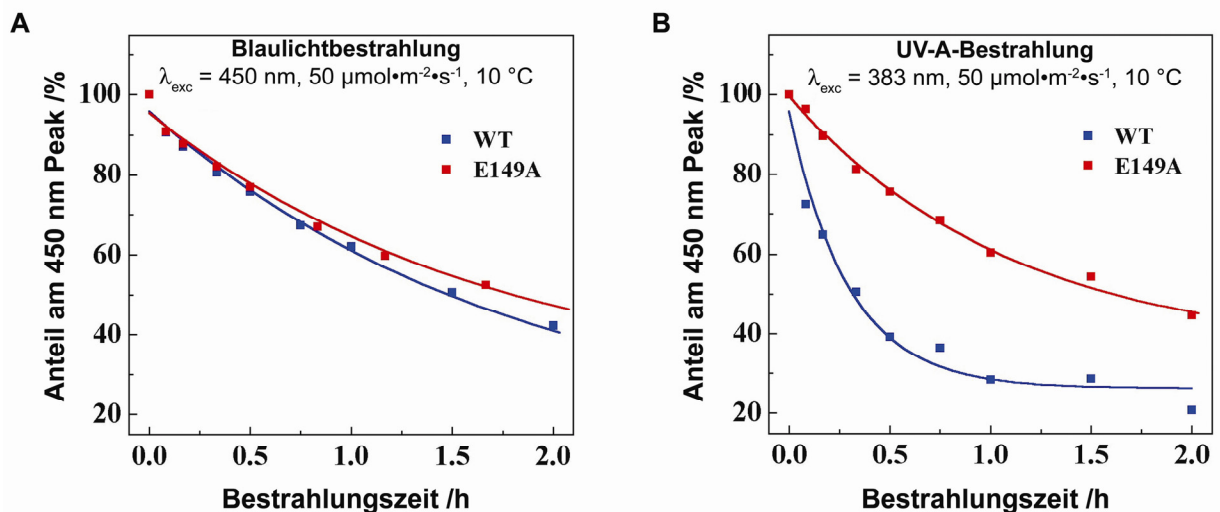
Cryptochrom 3 enthält die beiden Cofaktoren FAD und MTHF ebenfalls im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1:1 [Song, 2006].



**Abbildung 5.16:** A) Absorptionsspektren von Wildtyp und E149A-Mutante aus *A. thaliana* Cry3. Die Vergrößerung zeigt den für die semichinoide Spezies charakteristischen Bereich. B) Fluoreszenzanregungsspektrum (gepunktete Linien) und -emissionsspektrum (durchgezogene Linien) des bei pH=2.0 von Cry3-E149A freigesetzten Cofaktors. C) Fluoreszenzemissionsspektrum ( $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$ ) von Cry3-E149A bei pH=2.0 und nach pH-Wert-Änderung auf 10.0 im Anschluss aufgenommenes Spektrum. Abbildung nach [Klar, 2007].

Blaulichtbestrahlung ( $\lambda = 450 \text{ nm}$ ) von nativem Cry3 und der E149-Mutante führte zu verringerten Absorptionen bei 450 nm, die jedoch mit Halbwertszeiten für den Absorptionsabfall von  $t_{1/2} = 76 \pm 7 \text{ min}$  für den Wildtyp und  $t_{1/2} = 72 \pm 5 \text{ min}$  für die Mutante

auf ähnlichem Niveau liegen (Abbildung 5.17 A). Ein sehr markanter Unterschied tritt beim Vergleich der Kinetiken und Halbwertszeiten nach UV-A-Bestrahlung ( $\lambda = 383$  nm) auf. Die Mutante zeigt gegenüber dem Wildtyp ( $t_{1/2} = 12 \pm 2$  min) mit  $t_{1/2} = 46 \pm 4$  min eine fast vierfach höhere Halbwertszeit in Bezug auf den Anteil am 450 nm Maximum (Abbildung 5.17 B). Verbunden damit ist eine um diesen Faktor schnellere Photoreduktion zum FADH<sup>-</sup> im Wildtyp, die durch die MHTF-freie E149A-Mutante mit dieser Geschwindigkeit nicht erbracht werden kann. Diese Ergebnisse decken sich mit der schon früher dokumentierten Rolle des MTHF als effektives und funktionelles Antennenchromophor in *A. thaliana* Cry3 sowie dem in spektroskopischen Untersuchungen bestätigten effizienten Energietransfer zwischen MTHF und FAD [Song, 2006].



**Abbildung 5.17:** Veränderungen der Absorptionsspektren bei kontinuierlicher Bestrahlung von *A. thaliana* Cry 3 Wildtyp und E149A-Mutante mit **A)** Blaulicht ( $\lambda = 450$  nm) oder **B)** UV-A-Licht ( $\lambda = 383$  nm). Abbildung nach [Klar, 2007].

#### 5.4. *A. thaliana* Cryptochrom 3 als spezifische Photolyase für einzelsträngige DNA

Es konnte bereits gezeigt werden, wie ein CPD-Schaden, lokalisiert in einem 14mer DNA-Doppelstrang (siehe Kapitel 5.1) oder in einem einzelsträngigen Minimalsubstrat (siehe Kapitel 5.2), von *A. nidulans* Photolyase gebunden wird. Nach der Strukturlösung von Cryptochrom 3 aus *A. thaliana* (siehe Kapitel 5.3) wurde dieses den Photolyasen verwandte

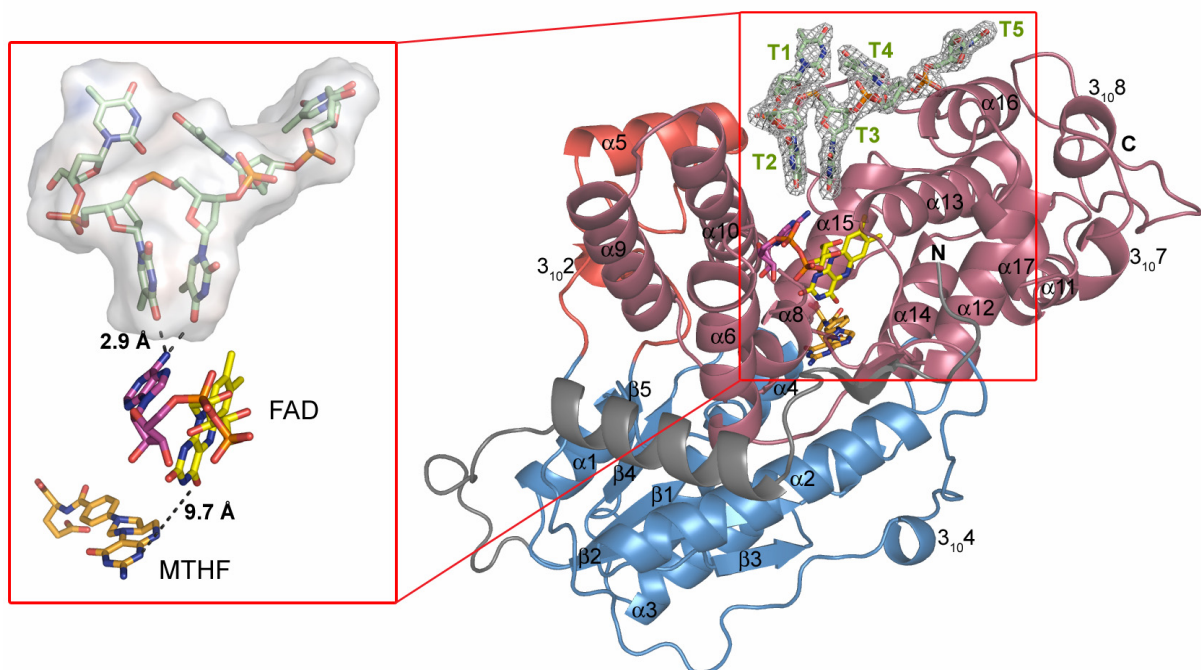
Flavoprotein ebenfalls mit dem Minimalschaden 5'-TpT $\diamond$ TpTpTp-3' kokristallisiert und strukturell charakterisiert. Die einzelstrangspezifische Reparaturaktivität eines DASH-Typ Cryptochroms konnte 2006 von Selby und Sancar [Selby, 2006] erstmals in VcCry1 und VcCry2 aus *Vibrio cholerae* experimentell nachgewiesen werden. Aufgrund der nur eingeschränkten Ähnlichkeit zu Photolyasen und dieser erst kürzlichen Entdeckung waren bisher keine Erkenntnisse über die Struktur eines solchen Enzym/Substrat-Komplexes und der während der Reparatur ablaufenden Elektronentransportprozesse bekannt.

### 5.4.1. Kokristallstruktur des Cryptochrom 3/DNA-Komplexes

Die im Folgenden diskutierte Strukturanalyse bezieht sich, sofern nicht explizit auf anderes hingewiesen wird, auf Komplex A. Die vier Komplexe A, B, D und E zeigen in nahezu allen Einzelheiten eine identische Struktur. Die gebundene einzelsträngige DNA weist erwartungsgemäß und in Übereinstimmung mit in *A. nidulans* Photolyase gebundener Doppelstrang-DNA ausschließlich Wechselwirkungen zwischen ihrem Phosphodesoxyribose-Rückgrat und dem Proteinteil des Enzyms auf. Der CPD-Schaden wird in der Bindungstasche spezifisch gebunden und beide Thymine sind vollständig in das aktive Zentrum hereingedreht (Abbildung 5.18). Der Vergleich der Kokristallstruktur mit der Struktur des reinen Proteins veranschaulicht, mit einem r.m.s.d.-Wert von nur 0.440 Å für 497 C $\alpha$ -Atome, die insgesamt geringen strukturellen Änderungen während der DNA-Bindung. Bis auf einige Unterschiede in der Kontaktregion von DNA und Protein sind im restlichen Protein keine auffälligen Abweichungen vom nativen Protein feststellbar. Die Ähnlichkeiten zwischen dem freien Enzym und dem DNA-Enzym-Komplex, sind somit bei *A. thaliana* Cryptochrom 3 nochmals deutlich größer, als dies beim *A. nidulans* Photolyase/DNA-Komplex der Fall ist (siehe Kapitel 5.1.1).

Die Spezifität gegenüber DNA verhält sich in *A. thaliana* Cryptochrom 3 deutlich anders als bei Photolyasen. Während Letztere zur Erkennung und Reparatur sowohl einzel- als auch doppelsträngiger DNA in der Lage sind, besitzt das untersuchte Cryptochrom ausschließlich die Fähigkeit, einzelsträngige DNA zu binden und einen darin befindlichen CPD-Schaden zu reparieren [Pokorny, 2006; Selby, 2006]. Dies lässt vermuten, dass der in Photolyasen für die Wechselwirkungen mit dem Gegenstrang verantwortliche Proteinteil bei *A. thaliana* Cry3 verändert ist und nicht in gleichem Maß agieren kann. Wichtige Interaktionen mit einem komplementären DNA-Strang, die die erforderliche zusätzliche Energie für die notwendige

starke Biegung der DNA bei der Komplexbildung liefern, könnten daher nicht zustande kommen. Der in diesem Zusammenhang diskutierte Einfluss der  $\alpha 6$ -Helix (*A. thaliana*:  $\alpha 5$ ) im *A. nidulans* Photolyase/DNA-Komplex (siehe Kapitel 5.1.1) scheint in Cryptochrom 3 nicht ausreichend zu sein. Am N-terminalen Teil des Segments, der in die kleine Furche am 5'-Ende der DNA ragt, befinden sich hier anstelle der kleinen Seitenketten G150 und P151 die deutlich größeren, polaren Reste T195 und Q196. Unter DNA-Bindung verschiebt sich die gesamte Helix um 0.6 Å, während die Substratbindung bei der Photolyase aus *A. nidulans* eine Konformationsänderung von 1.2 Å hervorruft und Wasserstoffbrücken mit den Phosphaten P<sup>-4</sup> und P<sup>-5</sup> des Gegenstrangs ausgebildet werden. Die von S449 bis E460 reichende Helix  $\alpha 16$  (*A. nidulans*:  $\alpha 18$ ) bewegt sich im Komplex um etwa 0.4 Å, statt 0.6 Å bei *A. nidulans* Photolyase, was zu mehreren Interaktionen mit dem Phosphat P<sup>+2</sup> führt (Abbildung 5.19). Diese Wechselwirkungen sind in dem bereits vorher charakterisierten Photolyase/DNA-Komplex ebenfalls konserviert.

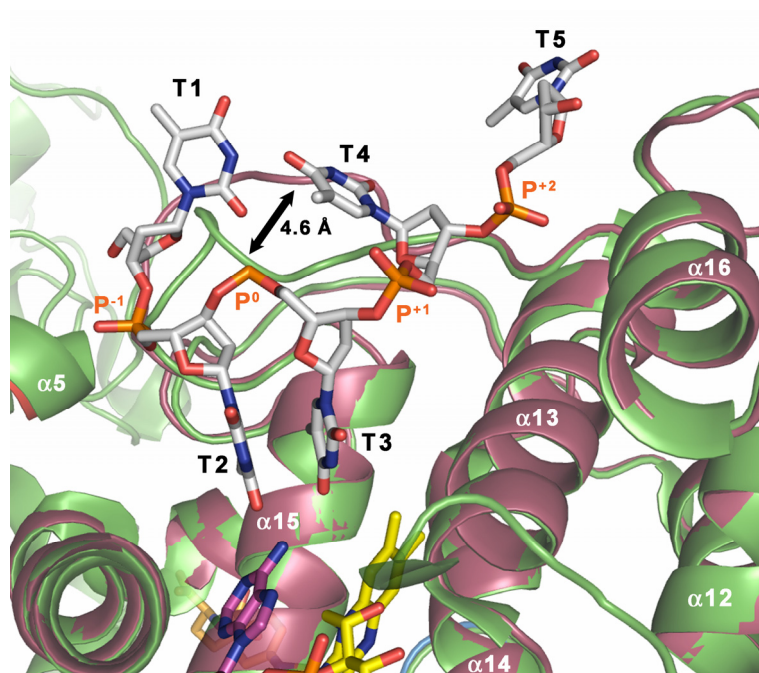


**Abbildung 5.18:** Bändermodell von Komplex A und  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ -Dichte (konturiert bei  $1\sigma$ ). Die katalytische Domäne von *A. thaliana* Cryptochrom 3 ist dunkelrot, die Antennendomäne blau dargestellt. Besonders markiert sind weiterhin die  $\alpha 5$ -Helix (hellrot) und die N-terminale Verlängerung (grau). Die gebundene DNA ist grün dargestellt. Abgesehen vom Adeninrest des FAD (pink) sind die Cofaktoren gelb gekennzeichnet. Die Bezeichnungen der Sekundärstrukturelemente sind von *Synechocystis sp. PCC6803* CryDASH (pdb-code: 1NP7) übernommen [Brudler, 2003].

### 5.4.2. Das Thymin-Dimer in der katalytischen Bindungstasche

Die  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ -Elektronendichte am ursprünglichen Thymindimer zeigt ebenfalls eine Spaltung der C5-C5 und C6-C6-Bindungen des eingesetzten synthetischen CPD-Schadens. Somit ist in der aktiven Tasche das aus der Reparatur des Cyclobutanthymindimers hervorgegangene Thymin-Thymin-Dinukleotid gebunden. Die Komplexe A bis E zeigen eine vollständige Besetzung mit DNA, die bei der Cokristallisation mit 10 % Überschuss eingesetzt wurde. Einzig Komplex F weist eine Besetzungszahl von nur 60 % auf. Eine eingehendere Analyse der DNA-Bindung steht in diesem Fall noch aus. Im Gegensatz zu den Komplexen A, B, D und E variiert die Konformation der Thymine in Komplex C etwas.

Vom Thymin-Dinukleotid werden zahlreiche Wechselwirkungen mit den Resten in der aktiven Tasche des Enzyms ausgebildet. Viele der wichtigen Aminosäuren dieser Region sind im Vergleich mit *A. nidulans* Photolyase konserviert. So finden sich beispielsweise nahezu alle Interaktionen der Seitenketten oder des Proteinerückgrats mit der DNA in dem Cryptochrom3/DNA-Komplex wieder, obgleich einige Veränderungen des Proteins erkennbar sind.



**Abbildung 5.19:** Strukturelle Verschiebungen innerhalb des aktiven Zentrums bei der Bindung CPD-haltiger einzelsträngiger DNA an *A. thaliana* Cryptochrom 3. Die Aminosäuren des freien Enzyms (pdb-code: 2J4D) sind grün, Cryptochrom 3 mit gebundener DNA violett, enthaltene Cofaktoren gelb und die DNA weiß dargestellt (Stäbchenmodell).

Die Aminosäurekette der Loopregion  $\alpha 15$ - $\alpha 16$  (V438-Y447) verschiebt ihre Position bei Substratbindung an das Enzym um bis zu 4.6 Å und ermöglicht so mehrere stabilisierende Wechselwirkungen der DNA durch die Seitenketten von E444 und R446 sowie der Hauptkette von D445 mit T<sup>1</sup> und T<sup>4</sup> (Abbildung 5.19). Der auf der Rückseite der Bindungstasche liegende Tyrosinrest Y434 (*A. nidulans*: W392) bildet eine Wasserstoffbrücke zu dem Phosphat P<sup>-1</sup> aus, das in der *A. nidulans*-Vergleichsstruktur nur die Amidbindung von G150 in der näheren Umgebung besitzt. Das Phosphat P<sup>+1</sup> wird durch den Ausbau von zwei Wasserstoffbrücken mit den Resten R392 und Y457 (*A. nidulans*: R350, F415) ebenfalls sehr gut in seiner Position gehalten. Die Stabilisierung des Phosphats P<sup>+2</sup> wird durch die beiden konservierten Reste K452 und Q453 (*A. nidulans*: K414, Q411) gewährleistet.

Die Ausbildung einer hydrophoben Tasche kommt durch die Anordnung der unpolaren Reste W321, F324, W328, F332 und F448 entlang der CPD-Bindungstasche zustande und könnte das Herausflippen des CPD-Schadens unterstützen.

#### 5.4.3. Der katalytische Cofaktor und Elektronentransferwege

Alle bekannten Cryptochrome besitzen ein Flavinadenindinucleotid (FAD) als Cofaktor. Wie auch in der Enzymfamilie der Photolyasen scheint er eine wesentliche Rolle für die Photoreaktivierung geschädigter DNA zu spielen.

Auffallend ist die planare Anordnung des in seiner geschlossenen, U-förmigen Konformation vorliegenden FAD in der Bindungstasche. Das Flavin liegt vollständig oxidiert vor und weist daher keine Verbiegung entlang seiner N5-N10-Achse auf, wie dies in den Komplexstrukturen der *A. nidulans* Photolyase zu beobachten ist. Die Abstände der beiden Thyminen vom Adeninrest des FAD sind mit 2.9 Å bzw. 3.0 Å für das 3'-Thymin bzw. das 5'-Thymin nahezu identisch und lassen einen den Photolyasen ähnlichen indirekten Elektronentransport vermuten, der vom Isoalloxazinring ausgeht (siehe Kapitel 5.1.3).

### 5.5. Inkorporierung natürlicher und artifizierter Flavinanaloga in die DNA-Photolyase aus *T. thermophilus*

Die Bindung geschädigter DNA an CPD-Photolyasen erfolgt in einem lichtunabhängigen Schritt. Für die anschließende Reparatur der Läsion ist jedoch Licht ( $\lambda = 350\text{-}450\text{ nm}$ ) als Energiequelle unabdingbar. Eine Reparaturaktivität der Photolyasen ist daher nur unter dem Einfluss von Tageslicht beobachtbar. Die Absorption der Lichtenergie wird, abgesehen von einer archaealen Photolyase aus *Sulfolobus tokodaii* [Fujihashi, 2007], von einem nicht-FAD-Cofaktor wahrgenommen, der diese auf den katalytischen Cofaktor FAD überträgt. Seine Funktion besteht bisherigen Erkenntnissen zufolge ausschließlich in der Steigerung der Quantenausbeute beziehungsweise in der Erweiterung des Aktivitätsspektrums des Enzyms [Kim, 1992].

Als funktionelle Antennenchromophore in bis dato charakterisierten DNA-Photolyasen waren nur 5,10-Methenyltetrahydrofolat (MTHF) und 7,8-Didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin (8-HDF) bekannt. In eigenen und kürzlich veröffentlichten Arbeiten an *T. thermophilus* DNA-Photolyase konnte FMN als neues funktionelles Antennenpigment in Klasse I DNA-Photolyasen nachgewiesen werden [Klar, 2006; Ueda, 2005].

Aufgrund dieser Erkenntnisse sollte untersucht werden, ob die Möglichkeit besteht, verschiedene nicht-natürliche Cofaktoren anstelle des in *T. thermophilus* Photolyase nachgewiesenen FMN einzubauen und somit das natürliche Aktivitätsspektrum zu erweitern.

#### 5.5.1. Reparaturaktivitäten der Holo- und Apophotolyase

Wie gezeigt werden konnte, handelt es sich im Fall von FMN um ein alternatives, funktionelles Antennenchromophor. Dessen spektrale Charakteristika mit einem Absorptionsmaximum bei  $\lambda_{\text{max}} \approx 445\text{ nm}$  und Emissionsmaximum bei  $\lambda_{\text{max, em}} \approx 520\text{ nm}$  sind nahezu ideal für einen nach dem Förster-Mechanismus verlaufenden Energietransfer vom FMN auf den katalytischen Cofaktor FAD. Der aus der Kristallstruktur der Holophotolyase ermittelbare Orientierungsparameter  $\kappa^2$  beträgt 3.4 für die oben angeführte Energieübertragung und liegt damit relativ nahe am Maximum von 4.0.

Die beiden in Photolyasen nachgewiesenen bekannten Antennencofaktoren besitzen mit  $\lambda_{\text{max, em}} \approx 460\text{-}480\text{ nm}$  (MTHF) [Pokorny, 2005; Jorns, 1984] und  $\lambda_{\text{max, em}} \approx 470\text{ nm}$  (8-HDF) [Eker, 1990] ein für die Anregung des katalytisch aktiven  $\text{FADH}^\cdot$  bedeutsames, großes



Überlappungsintegral der Absorptions- und Emissionsspektren von FMN und FADH<sup>-</sup>. Das zu größeren Wellenlängen verschobene Emissionsspektrum von FMN ( $\lambda_{\text{max, em}} \approx 520 \text{ nm}$ ) weist demgegenüber ein signifikant kleineres Überlappungsintegral auf, so dass die Effektivität für die direkte Anregung von FADH<sup>-</sup> deutlich geringer ausfällt. An *E. coli* Photolyase durchgeführte *in vivo*-Studien mit einer Mutation in der Elektronentransportkette kommen zu dem Ergebnis, dass etwa 25 Reparaturzyklen mit einem vollständig reduzierten FADH<sup>-</sup> von dem Enzym erbracht werden. Im Durchschnitt wird nach dieser Zyklenzahl das sonst kurzzeitig auf den DNA-Schaden transferierte Elektron nicht mehr auf das halbreduzierte FADH<sup>-</sup> zurückübertragen [Kavakli, 2004].

Sofern die *T. thermophilus* Photolyase eine höhere Verlustrate für das Elektron während des katalytischen Prozesses besitzt und die Effektivität der Energieübertragung geringer ist, könnte die beobachtete achtfach höhere CPD-Reparaturrate in Gegenwart der FMN-Antenne unter dem Einfluss von Blaulicht (siehe Kapitel 4.4.6) ebenfalls durch eine schnell stattfindende Photoreduktion des einfach reduzierten FADH<sup>-</sup> durch ein weiteres Photon erklärt werden [MacFarlane IV, 2003].

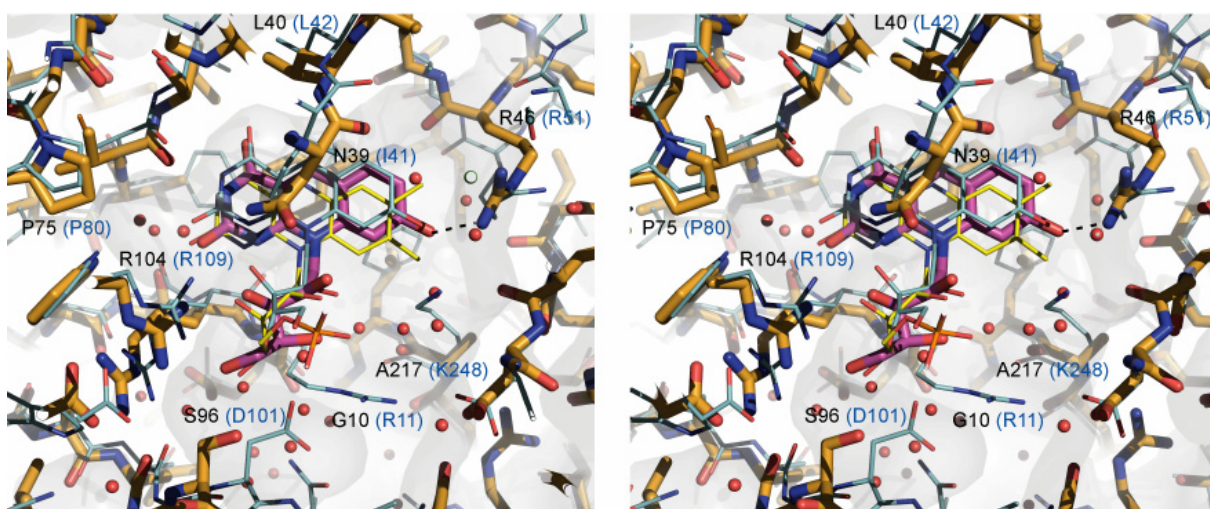
### 5.5.2. Einbau von 8-HDF in die Antennenchromophorbindungs tasche

Bereits bei der Analyse der Struktur der Apophotolyase aus *T. thermophilus* entstand die Vermutung, dass dieses Enzym, ähnlich wie die Klasse I DNA-Photolyase aus dem Cyanobakterium *A. nidulans*, 8-HDF in seiner Antennenchromophorbindungsstelle aufnehmen kann [Komori, 2001]. Gleichwohl zeigt die Genomsequenz aus *T. thermophilus*, dass die für die biologische Synthese von 8-HDF essentiellen Gene *cofG* und *cofH* fehlen und bisher noch keine weiteren 8-HDF oder F<sub>420</sub> abhängigen Enzyme aus diesem Organismus gefunden werden konnten [Ueda, 2005]. Aus diesem Grund ist es für dieses Enzym notwendig, einen alternativen, hitzeresistenten Antennencofaktor zu verwenden.

Die gelungene Inkorporierung von 8-HDF in das Enzym erfolgte durch *soaking* in native *T. thermophilus* Photolyasekristalle. Die bei einer Auflösung von 1.95 Å berechnete Differenzelektronendichte weist bei einer Konturierung von 1  $\sigma$  eindeutig die stöchiometrische Bindung von 8-HDF in der Antennenchromophorbindungsstelle auf (Abbildung 5.23 B). Im Gegensatz dazu gelang es überraschenderweise nicht, das im direkten Vergleich zu 8-HDF an der 5'-Hydroxylgruppe mit einem Oligoglutamylrest veresterte

Deazaflavin F<sub>420</sub> unter diesen Bedingungen an das Enzym zu binden.

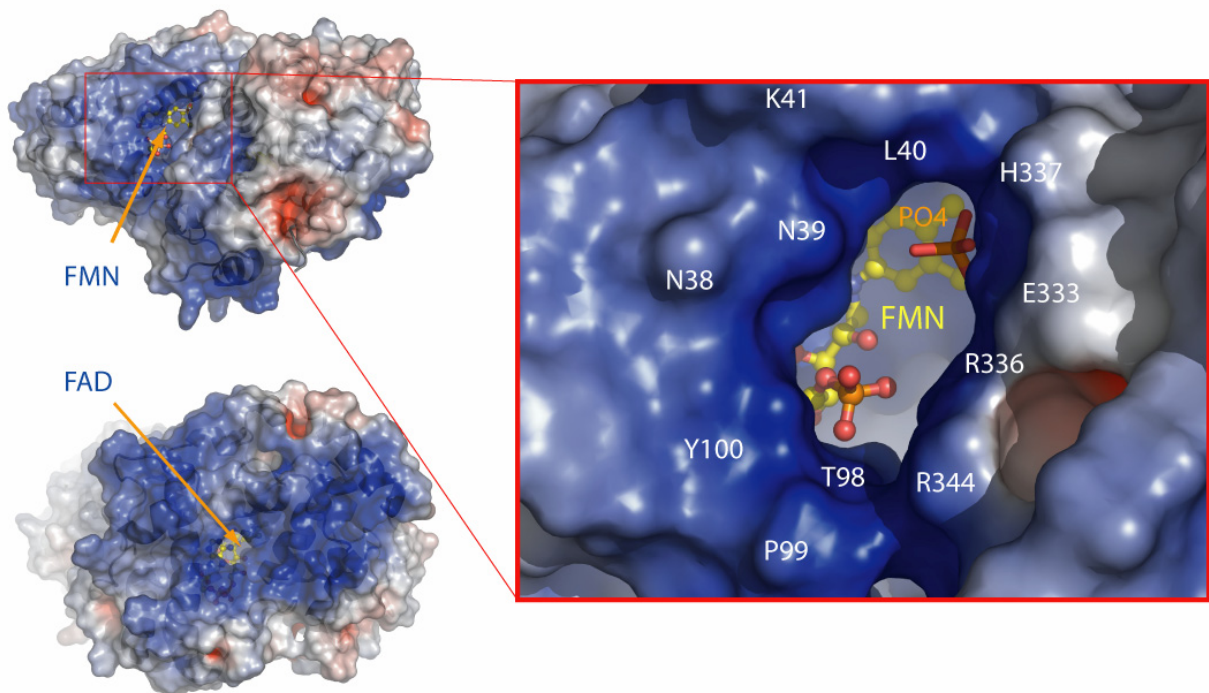
Der Bindungsmodus von 8-HDF ähnelt stark dem von FMN im Holoenzym und dem von 8-HDF in *A. nidulans* Photolyase (Abbildung 5.20). Der Abstand zum katalytischen FAD ist auf 15.4 Å verringert, das aromatische System von 8-HDF um etwa 0.7 Å verschoben und um 5.3 Å im Vergleich zum FMN im Holoenzym verkippt. Ebenso bildet die 5'-Hydroxylgruppe des 8-HDF eine Wasserstoffbrücke mit R104 aus, welche bei FMN aufgrund des Vorhandenseins des endständigen Phosphats durch die 4'-Hydroxylgruppe zustande kommt. Abgesehen von der sehr ähnlichen Bindung von 8-HDF in *A. nidulans* sind die an den Bindungen mit dem Chromophor beteiligten Aminosäurereste nur teilweise konserviert. So bildet beispielsweise in der *T. thermophilus* Photolyase Phenylalanin F50 gemeinsam mit V33 und L218 eine hydrophobe Tasche im Bereich des Isoalloxazinrestes aus, während die korrespondierenden Aminosäuren des *A. nidulans* Enzyms durch Leucin L55 und die beiden flankierenden Phenylalanine F35 und F249 ausgetauscht sind. Ähnlich verhält es sich mit N39, dessen Stickstoffatom der Amidgruppe zum Pyrimidinring des Isoalloxazinrings zeigt, während dieser bei der *A. nidulans* Photolyase durch die hydrophobe Aminosäure I41 ersetzt ist.



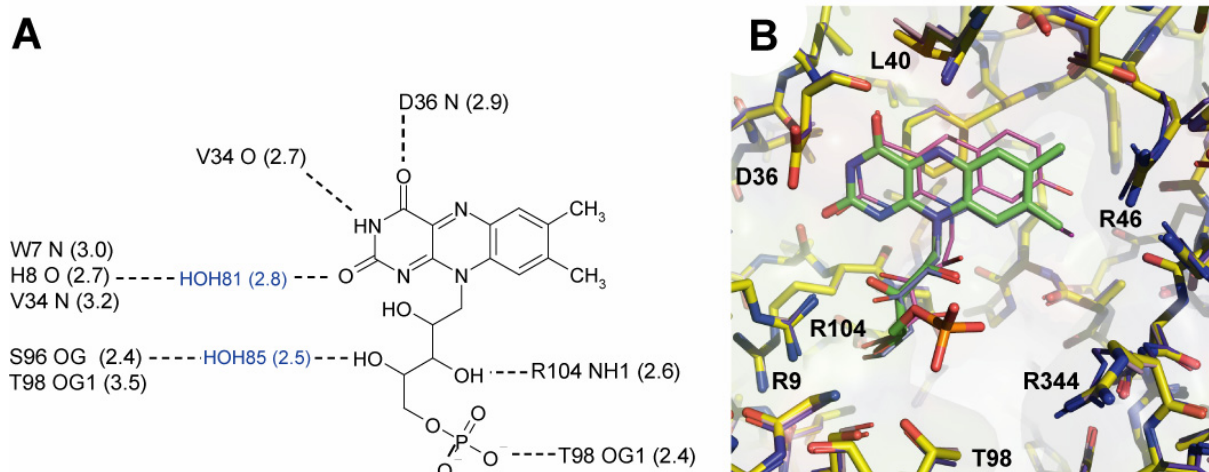
**Abbildung 5.20:** Stereodiagramm der Antennenbindungsstelle. Dargestellt ist der Vergleich von in *T. thermophilus* Photolyase gebundenem 8-HDF (violett, Proteinumgebung: orange) mit *A. nidulans* Photolyase (hellblau). Zur Veranschaulichung ist zusätzlich das in *T. thermophilus* Holophotolyase vorhandene FMN eingezeichnet (gelb). Abbildung nach [Klar, 2006].

Es besteht ein wesentlicher Unterschied, der die Präferenz der Photolyase aus der Blaualge für 8-HDF erklären könnte. Der 8-Hydroxylrest wird hier von zwei Salzbrücken mit dem

konservierten Rest R51 (*T. thermophilus*: R46) und zusätzlich dem Lysinrest K248 stabilisiert. Dieser Rest ist in der *Thermus* Photolyase nicht konserviert. Stattdessen sitzt in dieser Position der Alaninrest A217, wodurch zusätzlicher Raum für die Methylsubstituenten an C7 und C8 des Isoalloxazinrings zur Verfügung gestellt wird (Abbildung 5.20, Abbildung 5.22).



**Abbildung 5.21:** Elektrostatische Oberflächendarstellung der *Thermus thermophilus* Holophotolyase, berechnet mit dem Programm APBS [Baker, 2001] bei einer Ionenstärke von 0.1 M (blau:  $+5 \text{ kcal} \cdot \text{e}^{-1}$ , weiß:  $0 \text{ kcal} \cdot \text{e}^{-1}$ , rot:  $-5 \text{ kcal} \cdot \text{e}^{-1}$ ). Die obere Abbildung zeigt die Bindungsregion von N-terminaler und katalytischer Domäne mit der gebundenen FMN-Antenne. Die untere Abbildung präsentiert die basische DNA-Bindungsstelle der Photolyase mit dem zentral angeordneten FAD-Cofaktor. Abbildung nach [Klar, 2006].



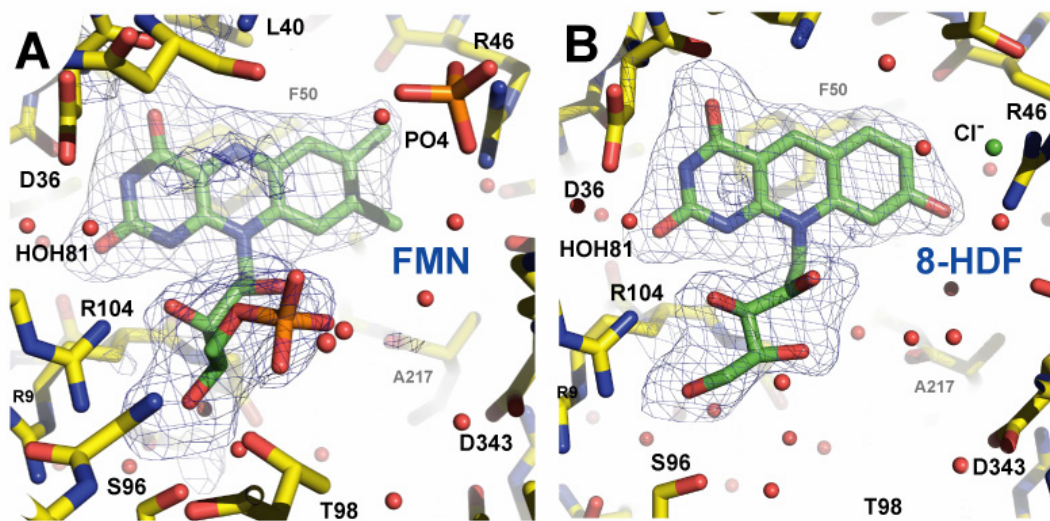
**Abbildung 5.22:** A) Diagramm der Wechselwirkungen zwischen FMN und umgebenden Aminosäuren. B) Überlagerung von FMN (grün), 8-HDF (violett) und 8-IRF (blau) in der Antennenbindungsstelle. Abbildung nach [Klar, 2006].

### 5.5.3. Einbau verschiedener Antennenchromophore

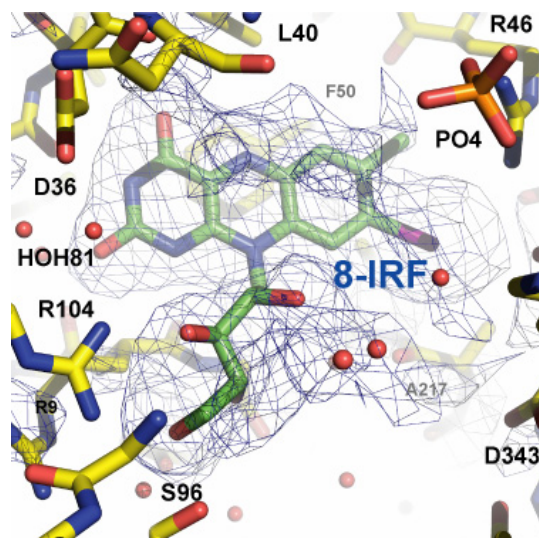
Die Flavinanaloga 8-Demethyl-8-cyanoriboflavin, 8-Demethyl-8-aminoriboflavin und Roseoflavin zeigen unter identischen *soaking*-Bedingungen keinen Einbau in das Enzym. Die nach röntgenkristallographischen Untersuchungen erhaltene Elektronendichte für das 5'-Phosphat des FMN in der jeweiligen Differenzelektronendichte der Antennenpigmentbindungstasche zeigt ausschließlich das bereits ursprünglich gebundene, native FMN an.

Die generelle Gemeinsamkeit für diese künstlich synthetisierten, eingesetzten Flavinanaloga ist die Substitution an der C8-Position des Isoalloxazinsystems. Durch die eingeführte positive Polarisierung könnte es zu einer elektrostatischen Abstoßung des konservierten Argininrest R46 kommen, der eine Bindung von FMN mit dessen neutraler C8-Methylgruppe gestattet. Dieser wie auch die Reste T42, R336, H337 und ein Phosphat- respektive ein Chloridion des Kristallisationspuffers sind an der Bindung in den Komplexen mit FMN und 8-HDF beteiligt. R46 ist essentiell für die Bindung von FMN, da ein Austausch gegen Glutamat einen vollständigen Verlust der Flavinbindung bewirkt (siehe Kapitel 4.4.4). Sofern diese Partialladungen und die hydrophoben Eigenschaften des C8-Substituenten eine maßgebliche Rolle bei der Selektivität der Flavinbindung spielen, sollten hydrophobere Reste mit einer weniger ausgeprägten positiven Ladung an dieser Position besser für einen Einbau artifiziereller Flavine in Photolyasen geeignet sein.





**Abbildung 5.23:** Flavinbindung in der Antennenchromophorbindungsstelle von *Thermus thermophilus*. Die Flavine **A)** FMN und **B)** 8-HDF sind grün, die Proteinumgebung gelb dargestellt. Die Differenzelektronendichte  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  ist bei einem Konturierungsgrad von  $3\sigma$  veranschaulicht. Abbildung nach [Klar, 2006].



**Abbildung 5.24:** Bindung von 8-IRF in der Antennenchromophorbindungsstelle von *Thermus thermophilus*. Das Flavin ist grün, die Proteinumgebung gelb dargestellt. Die Differenzelektronendichte  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  ist bei einem Konturierungsgrad von  $3\sigma$  veranschaulicht. Abbildung nach [Klar, 2006].

Das künstlich hergestellte 8-Iodo-8-demethyriboflavin (8-IRF) genügt durch das voluminöse und nur sehr schwach polarisierte Iod als Substituent an der C8-Position den oben angeführten Bedingungen. Aufgrund der beobachteten Toleranz für verschiedene Flavincofaktoren in der Antennenbindungsstelle wurde daher das 8-IRF in native Photolyasekristalle *gesoakt* und anschließend kristallographisch vermessen. Die resultierende Differenzelektronendichte bestätigt unzweifelhaft das in der Antennentasche gebundene 8-Iodo-8-demethyriboflavin bei einer Auflösung von 2.6 Å. Der festgestellte Bindungsmodus gleicht dem der beiden bereits genannten Flavine FMN und 8-HDF (Abbildung 5.23, Abbildung 5.24).

## 6. Ausblick

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnten viele offene Fragen in Bezug auf Klasse I CPD-Photolyasen und Cryptochrom 3 aus *A. thaliana* beantwortet werden. Zur Aufklärung, auf welchem Weg der Elektronentransfers zum CPD-Schaden verläuft, lieferte diese Struktur bereits viele wertvolle Hinweise für andere Experimente [Prytkova, 2007; Kao, 2005]. Zu klären bleibt weiterhin die Frage und wie das Glutamat E283 das intermediär gebildete Radikalanion des CPD im aktiven Zentrum stabilisieren kann. Mutationsstudien mit einer neutralen Aminosäure an dieser Position würden bei der Beobachtung einer Verringerung der Quantenausbeute eine maßgebliche Rolle dieses Aminosäurerestes während des Katalysezyklus bestätigen.

Bisher bestehen nur Hinweise darauf, dass die Dimerspaltung in zwei Schritten abläuft. Eine genauere Erkenntnis für diesen Reaktionsablauf könnte über ultrakurzzeitspektroskopische Messungen gewonnen werden. Nach Abschluss dieser Studien sollte es gelungen sein, ein umfassendes Verständnis über den Reaktionsmechanismus von Klasse I CPD-Photolyasen zu erhalten.

Strukturen von Klasse II- und (6-4)-Photolyasen sind bislang ebenso unbekannt wie die ihnen zugrunde liegenden Bindungs- und Reparaturmechanismen. Es bleibt daher abzuwarten, wann die derzeit unternommenen, intensiven Erforschungen auf diesem Gebiet erfolgreich sein werden.

Der hier geführte strukturelle Nachweis der CPD-Spaltung von einzelsträngiger DNA durch *A. thaliana* Cryptochrom 3 eröffnet zusätzlich zu den bisher bekannten CPD- und (6-4)-Photolyasen eine neue Klasse mit einzelstrangspezifischen DNA-Photolyasen. Es wird nun unter anderem zu klären sein, worin deren genaue Funktion besteht und welche weiteren Cryptochrome dieser Klasse zugehörig sind.

Mit dem Einbau von synthetisch maßgeschneiderten Flavinanaloga in die natürliche oder durch molekulares Modelling und Mutagenese modifizierte Antennenchromophorbindungstasche sollte es möglich sein, durch Wellenlängentuning das Aktionsspektrum von Photolyasen den gewünschten Vorstellungen entsprechend anzupassen.

## 7. Literaturverzeichnis

1. C. L. Afonso, E. R. Tulman, Z. Lu, E. Oma, G. F. Kutish and D. L. Rock (1999). "The Genome of *Melanoplus sanguinipes* entomopoxvirus." J. Virol. **73**(1): 533-552.
2. M. Ahmad and A. R. Cashmore (1993). "HY4 Gene of *A. thaliana* Encodes a Protein with Characteristics of a Blue-Light Photoreceptor." Nature **366**: 162-166.
3. J. Antony, D. M. Medvedev and A. A. Stuchebrukhov (2000). "Theoretical study of electron transfer between the photolyase catalytic cofactor FADH(-) and DNA thymine dimer." J. Am. Chem. Soc. **122**(6): 1057-1065.
4. C. Aubert, P. Mathis, A. P. Eker and K. Brettel (1999). "Intraprotein electron transfer between tyrosine and tryptophan in DNA photolyase from *Anacystis nidulans*." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(10): 5423-5427.
5. C. Aubert, M. H. Vos, P. Mathis, A. P. Eker and K. Brettel (2000). "Intraprotein Radical Transfer During Photoactivation of DNA Photolyase." Nature **405**(6786): 586-590.
6. N. A. Baker, D. Sept, S. Joseph, M. J. Holst and J. A. McCammon (2001). "Electrostatics of Nanosystems: Application to Microtubules and the Ribosome." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **98**(18): 10037-10041.
7. A. Batschauer (1993). "A Plant Gene for Photolyase: An Enzyme Catalyzing the Repair of UV-Light-Induced DNA Damage." Plant J. **4**: 705-709.
8. C. J. Bennett, M. Webb, D. O. Willer and D. H. Evans (2003). "Genetic and phylogenetic characterization of the type II cyclobutane pyrimidine dimer photolyases encoded by Leporipoxviruses." Virology **315**(1): 10-19.
9. J. Bennett and K. J. Scott (1971). "Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue." Anal Biochem **43**(1): 173-182.
10. H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov and P. E. Bourne (2000). "The Protein Data Bank." Nucleic Acids Res. **28**(1): 235-242.
11. F. Bernerd, D. Asselineau, C. Vioux, O. Chevallier-Lagente, B. Bouadjar, A. Sarasin and T. Magnaldo (2001). "Clues to Epidermal Cancer Proneness Revealed by Reconstruction of DNA Repair-deficient Xeroderma Pigmentosum Skin in vitro." PNAS **98**(14): 7817-7822.
12. V. A. Bohr, O. P. Ottersen and T. Tenjum (2007). "Genome Instability and DNA Repair in Brain, Ageing and Neurological Disease." Neuroscience **145**(4): 1183-1186.
13. J.-P. Bouly, E. Schleicher, M. Dionisio-Sese, F. Vandenbussche, D. Van Der Straeten,



- N. Bakrim, S. Meier, A. Batschauer, P. Galland, R. Bittl and M. Ahmad (2007). "Cryptochrome Blue Light Photoreceptors Are Activated Through Interconversion of Flavin Redox States." J. Biol. Chem. **282**(13): 9383-9391.
14. M. M. Bradford (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
15. D. E. Brash, W. A. Franklin, G. B. Sancar, A. Sancar and W. A. Haseltine (1985). "*Escherichia coli* DNA photolyase reverses cyclobutane pyrimidine dimers but not pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproducts." J. Biol. Chem. **260**(21): 11438-11441.
16. C. A. Brautigam, B. S. Smith, Z. Ma, M. Palnitkar, D. R. Tomchick, M. Machius and J. Deisenhofer (2004). "Structure of the Photolyase-Like Domain of Cryptochrome 1 from *Arabidopsis thaliana*." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(33): 12142-12147.
17. R. Brudler, K. Hitomi, H. Daiyasu, H. Toh, K.-I. Kucho, M. Ishiura, M. Kanehisa, V. A. Roberts, T. Todo, J. A. Tainer and E. D. Getzoff (2003). "Identification of a new cryptochrome class: Structure, function, and evolution." Mol. Cell **11**(1): 59-67.
18. A. Brünger, P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. Delano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J. S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson and G. L. Warren (1998). "Crystallography and NMR system: A new software package for macromolecular structure determinations." Acta Crystallogr. D **54**: 905-921.
19. A. T. Brünger (1992). "The free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures." Nature **355**: 472-475.
20. J. Butenandt, R. Epple, E.-U. Wallenborn, A. P. M. Eker, G. V. and T. Carell (2000). "A comparative repair study of thymine- und uracil-photodimers with model compounds and a photolyase repair enzyme." Chem. Eur. J. **6**: 62-72.
21. T. Carell, L. T. Burgdorf, L. M. Kundu and M. Cichon (2001). "The Mechanism of Action of DNA Photolyases." Curr. Opin Chem. Biol. **5**(5): 491-498.
22. A. R. Cashmore, J. A. Jarillo, Y. J. Wu and D. Liu (1999). "Cryptochromes: Blue Light Receptors for Plants and Animals." Science **284**(760-765).
23. CCP4 (1994). "The CCP4 suite: Programs for protein crystallography." Acta Crystallogr. D **50**: 760-763.
24. M. F. Ceriani, T. K. Darlington, D. Staknis, P. Mas, A. A. Petti, C. J. Weitz and S. A. Kay (1994). "Light-Dependent Sequestration of Timeless by Cryptochrome." Science **285**(5427): 553-556.
25. M. S. Cheung, I. Daizadeh, A. A. Stuchebrukhov and P. F. Heelis (1999). "Pathways of electron transfer in *Escherichia coli* DNA photolyase: Trp306 to FADH." Biophys J **76**(3): 1241-9.

26. K. S. Christine, A. W. MacFarlane IV, K. Yang and R. J. Stanley (2002). "Cyclobutylpyrimidine Dimer Base Flipping by DNA Photolyase." J. Biol. Chem. **277**(41): 38339-38344.
27. C. S. Cockell and G. Horneck (2001). "The History of the UV Radiation Climate of the Earth—Theoretical and Space-based Observations." Photochem. Photobiol. **73**(4): 447-451.
28. H. Daiyasu, T. Ishikawa, K. Kuma, S. Iwai, T. Todo and H. Toh (2004). "Identification of cryptochrome DASH from vertebrates." Genes Cells **9**(5): 479-95.
29. D. R. Davies and D. M. Segal (1971). "Protein crystallization: Micro techniques involving vapor diffusion." Methods Enzymol. **22**: 266-269.
30. J. Deisenhofer (2000). "DNA Photolyases and Cryptochromes." Mutat. Res. **460**(3-4): 143-149.
31. W. L. Delano "The PyMol Molecular Graphics System" (2002) D. Scientific, Palo Alto, CA, USA.
32. W. J. Dower, J. F. Miller and C. W. Ragsdale (1988). "High Efficiency Transformation of *E. coli* By High Voltage Electroporation." Nucleic Acids Res. **16**: 6127-6145.
33. A. P. Eker, R. H. Dekker and W. Berends (1981). "Photoreactivating Enzyme from *Streptomyces griseus-IV*. On the Nature of the Chromophoric Cofactor in *Streptomyces griseus* Photoreactivating Enzyme." Photochem. Photobiol. **33**(1): 65-72.
34. A. P. Eker, P. Kooiman, J. K. Hessels and A. Yasui (1990). "DNA photoreactivating enzyme from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*." J Biol Chem **265**(14): 8009-15.
35. A. P. Eker, H. Yajima and A. Yasui (1994). "DNA Photolyase from the fungus *Neurospora crassa*. Purification, Characterization and Comparison with Other Photolyases." Photochem. Photobiol. **60**(2): 125-133.
36. A. P. M. Eker, J. K. C. Hessels and J. van der Velde (1988). "Photoreactivating Enzyme from the Green Alga *Scenedesmus acutus*. Evidence for the Presence of Two Different Flavin Chromophores." Biochemistry **27**(5): 1758-1765.
37. M. S. Eller, M. Yaar and B. A. Gilchrest (1994). "DNA damage and melanogenesis." **372**(6505): 413-414.
38. P. Emsley and K. Cowtan (2004). "Coot: model-building tools for molecular graphics." Acta Crystallographica Section D **60**(12 Part 1): 2126-2132.
39. R. A. Engh and R. Huber (1991). "Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement." Acta Crystallogr A **47**: 392-400.
40. L. O. Essen (2006a). Einzelsträngige CPD-haltige DNA wird in der Antennenregion

von *A. nidulans* DNA-Photolyase repariert. T. Klar.

41. L. O. Essen (2006b). "Photolyases and Cryptochromes: Common Mechanisms of DNA Repair and Light-Driven Signaling?" Curr. Opin. Struct. Biol. **16**(1): 51-59.
42. L. O. Essen and T. Klar (2006c). "Light-Driven DNA Repair by Photolyases." Cell. Mol. Life Sci. **63**(11): 1266-1277.
43. T. Finkel and N. J. Holbrook (2000). "Oxidants, Oxidative Stress and the Biology of Ageing." Nature **400**: 239-247.
44. E. C. Friedberg and R. D. Wood (2007). "New Insights into the Combined Cockayne/Xeroderma Pigmentosum Complex: Human XPG Protein can Function in Transcription Factor Stability." Mol. Cell **26**(2): 162-164.
45. M. Fujihashi, N. Numoto, Y. Kobayashi, A. Mizushima, M. Tsujimura, A. Nakamura, Y. Kawarabayasi and K. Miki (2007). "Crystal Structure of Archaeal Photolyase from *Sulfolobus tokodaii* with Two FAD Molecules: Implication of a Novel Light-Harvesting Cofactor." J. Mol. Biol. **365**(4): 903-910.
46. B. A. Gilchrest (1989). "Skin Aging and Photoaging: An Overview." J. Am. Acad. Dermatol. **21**(3): 610-613.
47. T. H. Grossman, E. S. Kawasaki, S. R. Punreddy and M. S. Osburne (1998). "Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability." Gene **209**(1): 95-103.
48. M. Hada, K. Hino, G. Buchholz, J. Goss, E. Wellman and M. Shin (2000). "Assay of DNA photolyase activity in spinach leaves in relation to cell compartmentation-evidence for lack of DNA photolyase in chloroplasts." Biosci. Biotechnol. Biochem. **64**(6): 1288-1291.
49. P. F. Heelis, S. T. Kim, T. Okamura and A. Sancar (1993). "The Photorepair of Pyrimidine Dimers by DNA Photolyase and Model Systems." J. Photochem. Photobiol. B **17**(3): 219-228.
50. P. F. Heelis, G. Payne and A. Sancar (1987). "Photochemical Properties of *Escherichia coli* DNA Photolyase: Selective Photodecomposition of the Second Chromophore." Biochemistry **26**(15): 4634-4640.
51. A. A. Henry, R. Jimenez, D. Hanway and F. E. Romesberg (2004). "Preliminary characterization of light harvesting in *E. coli* DNA photolyase." ChemBiochem **5**(8): 1088-1094.
52. K. Hitomi, S.-T. Kim, S. Iwai, H. Nariaki, E. Otsoshi, M. Ikenaga and T. Todo (1997). "Binding and Catalytic Properties of *Xenopus* (6-4) Photolyase." Biochemistry **272**(51): 32591-32598.
53. K. Hitomi, H. Nakamura, S. T. Kim, T. Mizukoshi, T. Ishikawa, S. Iwai and T. Todo (2001). "Role of two histidines in the (6-4) photolyase reaction." Journal of Biological

Chemistry **276**(13): 10103-10109.

54. J. H. J. Hoeijmakers (2001). "Genome Maintenance Mechanisms for Preventing Cancer." Nature **411**(6835): 366-374.
55. L. Holm and C. Sander (1993). "Protein structure comparison by alignment of distance matrices." J Mol Biol. **233**(1): 123-138.
56. D. S. Hsu, X. Zhao, S. Zhao, A. Kazantsev, R.-P. Wang, T. Todo, Y.-F. Wei and A. Sancar (1996). "Putative Human Blue-Light Photoreceptors hCRY1 and hCRY2 Are Flavoproteins." Biochemistry **35**(44): 13871-13877.
57. Y. Huang, R. Baxter, B. S. Smith, C. L. Partch, C. L. Colbert and J. Deisenhofer (2006). "Crystal Structure of Cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana* and its Implications for Photolyase Activity." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(47): 17701-17706.
58. I. Husain, G. B. Sancar, S. R. Holbrook and A. Sancar (1987). "Mechanism of damage recognition by *Escherichia coli* DNA photolyase." J. Biol. Chem. **262**: 13188-13197.
59. R. R. Iyer, A. Pluciennik, V. Burdett and P. L. Mordrich (2006). "DNA Mismatch Repair: Functions and Mechanisms." Chem. Rev. **106**(2): 302-323.
60. J. Jancarik and S. H. Kim (1991). "Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins." J Appl Cryst **24**: 409-411.
61. J. L. Johnson, S. Hamm-Alvarez, G. Payne, G. B. Sancar, K. V. Rajagopalan and A. Sancar (1988). "Identification of the Second Chromophore of *Escherichia coli* and Yeast DNA Photolyases as 5,10-Methenyltetrahydrofolate." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(7): 2046-2050.
62. R. E. Johnson, S. Prakash and L. Prakash (1999). "Efficient Bypass of a Thymine-Thymine Dimer by Yeast DNA Polymerase, Pol  $\eta$ ." Science **283**(5404): 1001-1004.
63. R. E. Johnson, M. T. Washington, S. Prakash and L. Prakash (2000). "Fidelity of Human DNA Polymerase  $\eta$ ." J Biol Chem **275**(11): 7447-7450.
64. T. A. Jones, J. Y. Zou, S. W. Cowan and Kjeldgaard (1991). "Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models." Acta Crystallogr A **47** (Pt 2): 110-9.
65. M. S. Jorns, G. B. Sancar and A. Sancar (1984). "Identification of a neutral flavin radical and characterization of a second chromophore in *Escherichia coli* DNA photolyase." Biochemistry **23**(12): 2673-9.
66. M. S. Jorns, B. Y. Wang, S. P. Jordan and L. P. Chanderkar (1990). "Chromophore Function and Interaction in *Escherichia coli* DNA Photolyase: Reconstitution of the Apoenzyme with Pterin and/or Flavin Derivatives." Biochemistry **29**(2): 552-561.
67. S. Kanai, R. Kikuno, H. Toh, H. Ryo and T. Todo (1997). "Molecular evolution of the

- photolyase-blue light photoreceptor family." *J. Mol. Evol.* **45**: 535-548.
68. Y.-T. Kao, C. Saxena, L. Wang, A. Sancar and D. Zhong (2005). "Direct observation of thymine dimer repair in DNA by photolyase." *PNAS* **102**(45): 16128-16132.
69. R. Kato, K. Hasegawa, Y. Hidaka, S. Kuramitsu and T. Hoshino (1997). "Characterization of a thermostable DNA photolyase from an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus* HB27." *J Bacteriol* **179**(20): 6499-503.
70. H. Kavakli and A. Sancar (2004). "Analysis of the role of intraprotein electron transfer in photoreactivation by DNA photolyase in vivo." *Biochemistry* **43**(48): 15103-15110.
71. K. C. Kelley, K. J. Huestis, D. A. Austen, C. T. Sanderson, M. A. Donoghue, S. K. Stickel, E. S. Kawasaki and M. S. Osburne (1995). "Regulation of sCD4-183 gene expression from phage-T7-based vectors in *Escherichia coli*." *Gene* **156**(1): 33-36.
72. A. Kelner (1949). "Effect of Visible Light on the Recovery of *Streptomyces griseus* conidia from Ultraviolet-Injury." *Proc Natl Acad Sci U S A* **35**: 73-79.
73. A. Kiener, I. Husain, A. Sancar and C. Walsh (1989). "Purification and properties of *Methanobacterium thermoautotrophicum* DNA photolyase." *J. Biol. Chem.* **264**: 13880-13887.
74. S.-T. Kim, P. F. Heelis and A. Sancar (1992). "Energy transfer (deazaflavin -> FADH<sub>2</sub>) and electron transfer (FADH<sub>2</sub> -> T<>T) kinetics in *Anacystis nidulans* photolyase." *Biochemistry* **31**: 11244-11248.
75. S. T. Kim, K. Malhotra, C. A. Smith, J.-S. Taylor and A. Sancar (1994). "Characterization of (6-4) Photoproduct DNA Photolyase." *J. Biol. Chem.* **269**(11): 8535-8540.
76. S.-T. Kim and A. Sancar (1991). "Effect of Base, Pentose, and Phosphodiester Backbone Structures on Binding and Repair of Pyrimidine Dimers by *Escherichia coli* DNA Photolyase." *Biochemistry* **30**(35): 8623-8630.
77. T. Klar (2003). Strukturelle und Funktionelle Charakterisierung einer Thermophilen DNA-Photolyase. Diplomarbeit, *Fachbereich Chemie*, Philipps-Universität Marburg.
78. T. Klar, G. Kaiser, U. Hennecke, T. Carell, A. Batschauer and L. O. Essen (2006). "Natural and Non-Natural Antenna Chromophores in the DNA Photolyase from *Thermus Thermophilus*." *Chembiochem* **7**(11): 1798-1806.
79. T. Klar, R. Pokorny, J. Moldt, A. Batschauer and L. O. Essen (2007). "Cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*: Structural and Functional Analysis of its Complex with a Folate Light Antenna." *J Mol Biol.* **366**(3): 954-964.
80. T. Kleine, P. Lockhart and A. Batschauer (2003). "An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles." *Plant J.* **35**(1): 93-103.

81. G. J. Kleywegt and T. A. Jones (1995). "Where freedom is given, liberties are taken." Structure **3**(6): 535-540.
82. H. Komori, R. Masui, S. Kuramitsu, S. Yokoyama, T. Shibata, Y. Inoue and K. Miki (2001). "Crystal structure of thermostable DNA photolyase: pyrimidine-dimer recognition mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(24): 13560-5.
83. R. Kort, H. Komori, S. Adachi, K. Miki and A. P. M. Eker (2004). "DNA apophotolyase from *Anacystis nidulans*: 1.8 Å structure, 8-HDF reconstitution and X-ray-induced FAD reduction." Acta Crystallogr. D **60**: 1205-1213.
84. K. H. Kraemer (1997). "Sunlight and skin cancer: Another link revealed." PNAS **94**(1): 11-14.
85. K. H. Kraemer, M. Lee, A. D. Andrews and W. C. Lambert (1994). "The Role of Sunlight and DNA Repair in Melanoma and Nonmelanoma Skin Cancer: The Xeroderma Pigmentosum Paradigm." Arch. Dermatol. **130**(8): 1018-1021.
86. K. H. Kraemer, N. J. Patronas, R. Schiffmann, B. P. Brooks, D. Tamura and J. J. DiGiovanna (2007). "Xeroderma Pigmentosum, Trichthiodystrophy and Cockayne Syndrome: A Complex Genotype-Phenotype Relationship." Neuroscience **145**(4): 1388-1396.
87. U. K. Laemmli (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**: 680-685.
88. A. A. Lamola (1973). "Photochemistry and Structure in Nucleic Acids." Pure Appl. Chem. **34**: 281-303.
89. T. Langenbacher, X. Zhao, G. Bieser, P. F. Heelis, A. Sancar and M. E. Michel-Beyerle (1997). "Substrate and temperature dependence of DNA photolyase repair activity examined with ultrafast spectroscopy." J. Am. Chem. Soc. **119**: 10532-10536.
90. J.-H. Lee, G.-S. Hwang and B.-S. Choi (1999). "Solution Structure of a DNA Decamer Duplex Containing the Stable 3' T-G Base Pair of the Pyrimidine(6-4)Pyrimidone photoproduct [(6-4) adduct]: Implications for the Highly Specific 3' T Right-Arrow C Transition of the (6-4) Adduct." PNAS **96**(12): 6632-6636.
91. B. Lewine (1991). Gene - Lehrbuch der molekularen Genetik. Weinheim, VCH-Verlagsgesellschaft.
92. K. M. Lima-Bessa and C. F. M. Menck (2005). "Skin Cancer: Lights on Genome Lesions." Curr. Biol. **15**(2): R58-R61.
93. C. Lin, D. E. Robertson, M. Ahmad, A. A. Raibekas, M. S. Jorns, P. L. Dutton and A. R. Cashmore (1995). "Association of Flavin Adenine Dinucleotide With the *Arabidopsis* Blue Light Receptor CRY1." Science **269**(968-970).
94. C. Lin and D. Shalitin (2003). "Cryptochrome structure and signal transduction." Annu. Rev. Plant Biol. **54**: 469-496.

95. C. Lin and T. Todo (2005). "The Cryptochromes." Genome Biology **6**(5): 220-229.
96. H. Ling, F. Boudsocq, B. S. Plosky, R. Woodgate and W. Yang (2003). "Replication of a *cis-syn* Thymine Dimer at Atomic Resolution." Nature **424**(6952): 1083-1087.
97. H.-L. Lo, S. Nakajima, L. Ma, B. Walter, A. Yasui, D. W. Ethell and L. B. Owen (2005). "Differential biologic effects of CPD and 6-4PP UV-induced DNA damage on the induction of apoptosis and cell-cycle arrest." BMC Cancer **5**: 135.
98. A. W. MacFarlane IV and R. J. Stanley (2003). "Cis-syn thymidine dimer repair by DNA photolyase in real time." Biochemistry **42**: 8558-8568.
99. K. Malhotra, S. T. Kim, A. Batschauer, L. Dawut and A. Sancar (1995). "Putative Blue-Light Photoreceptors from *Arabidopsis thaliana* and *Sinapis alba* with a High Degree of Sequence Homology to DNA Photolyase Contain the Two Photolyase cofactors but Lack DNA Repair Activity." Biochemistry **34**: 6892-6899.
100. K. Malhotra, S. T. Kim and A. Sancar (1994). "Characterization of a Medium Wavelength Type DNA Photolyase: Purification and Properties of Photolyase From *Bacillus firmus*." Biochemistry **33**(29): 8712-8718.
101. V. Massey, P. Hemmerich, W. R. Knappe, H. J. Duchstein and H. Fenner (1978). "Photoreduction of Flavoproteins and Other Biological Compounds Catalyzed by Deazavavins." Biochemistry **17**(1): 9-17.
102. C. Masutani, R. Kusomoto, S. Iwai and F. Hanaoka (2000). "Mechanisms of Accurate Translesion Synthesis by Human DNA Polymerase  $\eta$ ." EMBO J. **19**(12): 3100-3109.
103. K. McAteer, Y. Jing, J. Kao, J.-S. Taylor and M.-A. Kennedy (1998). "Solution-state structure of a DNA dodecamer duplex containing a *cis-syn* thymine cyclobutane dimer, the major UV photoproduct of DNA." J. Mol. Biol. **282**: 1013-1032.
104. S. McCready and L. Marcello (2003). "Repair of UV damage in *Halobacterium salinarum*." Biochem. Soc. Trans. **31**(3): 694-698.
105. I. MDL Information Systems "MDL Isis Draw 2.5" (2002) Camino Ramon, CA, USA.
106. D. Medvedev and A. A. Stuchebrokhov (2001). "DNA repair mechanism by photolyase: Electron transfer path from the photolyase catalytic cofactor FADH<sup>-</sup> to DNA thymine dimer." J. Theor. Biol. **210**: 237-248.
107. A. Mees (2005). Co-Kristallisation von DNA-Photolyase aus *A. nidulans* mit Thymidindimer enthaltender DNA Einbau von Flavin- und Desazaflavin-Cofaktoren in Oligonukleotide. Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München.
108. A. Mees, T. Klar, P. Gnau, U. Hennecke, A. P. Eker, T. Carell and L. O. Essen (2004). "Crystal structure of a photolyase bound to a CPD-like DNA lesion after in situ repair." Science **306**(5702): 1789-93.

109. K. Miki, T. Tamada, H. Nishida, K. Inaka, A. Yasui, P. E. de Ruiter and A. P. M. Eker (1993). "Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of photolyase (photoreactivating enzyme) from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*." J. Mol. Biol. **233**: 167-169.
110. H. J. Muller (1927). "Artificial Transmutation of the Gene." Science **66**: 84-87.
111. K. B. Mullis and F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol. **155**: 335-350.
112. G. N. Murshudov, A. A. Vagin and E. J. Dodson (1997). "Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method." Acta Crystallographica Section D **53**(3): 240-255.
113. K. A. O'Connor, M. J. McBride, M. West, H. Yu, L. Trinh, K. Yuan, T. Lee and D. R. Zusman (1996). "Photolyase of *Myxococcus xanthus*, a Gram-negative eubacterium, is more similar to photolyases found in Archaea and "higher" eukaryotes than to photolyases of other eubacteria." J. Biol. Chem. **271**(11): 6252-6259.
114. Z. Otwinowski and W. Minor (1997). Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. Methods in Enzymology. C. W. j. Carter, Sweet, R. M. New York, Academic Press. **276: Macromolecular Crystallography, part A**: 307-326.
115. S. Özgür and A. Sancar (2003). "Purification and Properties of Human Blue-Light Photoreceptor Cryptochrome 2." Biochemistry **42**(10): 2926-2932.
116. C. Papworth, J. C. Bauer, J. Braman and D. A. Wright (1996). "QuikChange site-directed mutagenesis." Strategies **9**(3): 3-4.
117. H. Park, K. Zhang, Y. Ren, S. Nadji, N. Sinha, J.-S. Taylor and C.-H. Kang (2002). "Crystal structure of a DNA decamer containing a *cis-syn* thymine dimer." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **99**: 15965-15970.
118. H. W. Park, S. T. Kim, A. Sancar and J. Deisenhofer (1995). "Crystal structure of DNA photolyase from *Escherichia coli*." Science **268**(5219): 1866-1872.
119. G. Payne, P. F. Heelis, B. R. Rohrs and A. Sancar (1987). "The Active Form of *Escherichia coli* DNA Photolyase Contains a Fully Reduced Flavin and Not a Flavin Radical, Both *in vivo* and *in vitro*." Biochemistry **26**(22): 7121-7127.
120. G. Payne, M. Wills, C. Walsh and A. Sancar (1990). "Reconstitution of *Escherichia coli* Photolyase with Flavins and Flavin Analogues." Biochemistry **29**(24): 5706-5711.
121. A. Perrakis, R. Morris and S. Lamzin Victor (1999). "Automated protein model building combined with iterative structure refinement." Nature Structural Biology **6**: 458-463.
122. A. Pezeshk, I. D. Podmore, P. F. Heelis and M. C. R. Symons (1996). "Electron addition to thymine dimers and related compounds: A mimic of natural repair." J.



- Phys. Chem. **100**: 19714-19718.
123. R. Pokorny (2006). Binding of single-stranded DNA in Cryptochrome 3 from *A. thaliana*. T. Klar.
  124. R. Pokorny, T. Klar, L.-O. Essen and A. Batschauer (2005). "Crystallization and preliminary X-ray analysis of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*." Acta Crystallogr. **F61**: 935-938.
  125. T. R. Prytkova, D. N. Beratan and S. S. Skourtis (2007). "Photoselected electron transfer pathways in DNA photolyase." PNAS **104**(3): 802-807.
  126. J. Rak, A. A. Voityuk, M.-E. Michel-Beyerle and N. Rösch (1999). "Effect of proton transfer on the anionic and cationic pathways of pyrimidine photodimer cleavage, a computational study." J. Phys. Chem. A **103**: 3569-3574.
  127. J.-L. Ravanat, T. Douki and J. Cadet (2001). "Direct and Indirect Effects of UV Radiation on DNA and Its Components." J. Photochem. Photobiol. B: Biology **63**(1-3): 88-102.
  128. N. B. Reuven, G. Arad, A. Maor-Shoshani and Z. Livneh (1999). "The Mutagenesis Protein UmuC Is a DNA Polymerase Activated by UmuD', RecA and SSB and Is Specialized for Translesion Replication." J. Biol. Chem. **274**(45): 31763-31766.
  129. E. Rosato, V. Codd, G. Mazzotta, A. Piccin, M. Zordan, R. Costa and C. P. Kyriacou (2001). "Light-Dependent Interaction Between Drosophila CRY and the Clock Protein PER Mediated by the Carboxy Terminus of CRY." Curr. Biol. **11**(12): 909-917.
  130. N. J. Saettel and O. Wiest (2001). "DFT study of the [2+2] cycloreversion of uracil dimer anion radical: Waters matter." J. Am. Chem. Soc. **123**: 2693-2694.
  131. J. Sambrook and D. W. Russell (2000). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  132. A. Sancar (1994). "Structure and Function of DNA Photolyase." Biochemistry **33**(1): 2-9.
  133. A. Sancar (2003). "Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors." Chem. Rev. **103**: 2203-2237.
  134. A. Sancar and W. D. Rupp (1983). "A novel repair enzyme: UVRABC excision nuclease of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region." Cell **33**(1): 249-260.
  135. A. Sancar and G. B. Sancar (1984). "*Escherichia coli* DNA Photolyase is a Flavoprotein." J. Mol. Biol. **172**(2): 223-227.
  136. G. B. Sancar (2000). "Enzymatic Photoreactivation: 50 Years and Counting." Mutat. Res. **451**(1-2): 25-37.

137. G. B. Sancar and A. Sancar (2006). "Purification and Characterization of DNA Photolyases." Methods Enzymol. **408**: 121-156.
138. G. B. Sancar, F. W. Smith, R. Reid, G. Payne, M. Levy and A. Sancar (1987). "Action mechanism of *Escherichia coli* DNA photolyase. I. Formation of the enzyme-substrate complex." J. Biol. Chem. **262**(1): 478-485.
139. D. B. Sanders and O. Wiest (1999). "A Model For The Enzyme-Substrate Complex Of DNA Photolyase And Photodamaged DNA." J. Am. Chem. Soc. **121**(22): 5127-5134.
140. F. Sanger, S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**: 5463-5467.
141. C. Saxena, H. Y. Wang, H. Kavakli, A. Sancar and D. P. Zhong (2005). "Ultrafast dynamics of resonance energy transfer in cryptochrome." J. Am. Chem. Soc. **127**(22): 7984-7985.
142. O. D. Schaerer (2003). "Chemistry and Biology of DNA Repair." Angew. Chem. Int. Ed. **42**(26): 2946-2974.
143. C. P. Selby and A. Sancar (2006). "A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity." PNAS **103**(47): 17696-17700.
144. R. B. Setlow and W. L. Carrier (1966). "Pyrimidine Dimers in Ultraviolet-irradiated DNA's." J. Mol. Biol. **17**(1): 237-254.
145. K. T. Smith, C. M. Long, B. Bowman and M. M. Manos (1990). "Using Cosolvents to Enhance PCR Amplification." Amplifications **5**(16-17).
146. S.-H. Song, R. Pokorny, B. Dick, L.-O. Essen, A. Batschauer and A. Penzkofer (2006). "Absorption and fluorescence spectroscopic characterization of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*." J. Photochem. Photobiol. B **85**(1): 1-16.
147. V. Srinivasan, W. M. Schnitzlein and D. N. Tripathy (2001). "Fowlpox Virus Encodes a Novel DNA Repair Enzyme, CPD-Photolyase, That Restores Infectivity of UV Light-Damaged Virus." J. Virol. **75**(4): 1681-1688.
148. R. Stanewsky, M. Kaneko, P. Emery, b. Beretta, K. Wager-Smith, S. A. Kay, M. Rosbash and J. C. Hall (1998). "The cry<sup>b</sup> Mutation Identifies Cryptochrome as a Circadian Photoreceptor in *Drosophila*." Cell **95**(5): 681-692.
149. E. A. Stura and I. A. Wilson (1992). "Seeding Techniques" in Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: A Practical Approach, Oxford University Press: 99-126.
150. D. L. Svoboda, C. A. Smith, J.-S. Taylor and A. Sancar (1993). "Effect of sequence, adduct type, and opposing lesions on the binding and repair of ultraviolet photodamage by DNA photolyase and (A)BC excinuclease." J. Biol. Chem. **268**(14): 10694-10700.
151. T. Tamada, K. Kitadokoro, Y. Higuchi, K. Inaka, A. Yasui, P. E. Deruiter, A. P. M.

- Eker and K. Miki (1997). "Crystal structure of DNA photolyase from *Anacystis nidulans*." Nature Struct. Biol. **4**(11): 887-891.
152. K. Tanaka, T. Kimachi, M. Kawase and F. Yoneda (1988). "First total synthesis of redox coenzyme factor 420." J. Chem. Soc. Chem. Commun.(8): 524-526.
153. M. Tanaka, S. Nakajima, M. Ihara, T. Matsunega, O. Nikaido and K. Yamamoto (2001). "Effects of photoreactivation of cyclobutane pyrimidine dimers and pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts on ultraviolet mutagenesis in SOS-induced repair-deficient *Escherichia coli*." Mutagenesis **16**(1): 1-6.
154. M. Tang, X. Shen, E. G. Frank, M. O'Donnell, R. Woodgate and M. F. Goodman (1999). "UmuD'2C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 8919-8924.
155. J.-S. Taylor (1990). "DNA, Sunlight and Skin Cancer." J. Chem. Edu. **67**(10): 835-841.
156. J.-S. Taylor (1995). "DNA, Sunlight and Skin Cancer." Pure Appl. Chem. **67**(1): 183-190.
157. R. J. Thresher, M. Hotz-Vitaterna, Y. Miyamoto, A. Kanzantsev, D. S. Hsu, C. Petit, C. P. Selby, L. Dawut, O. Smithies, J. S. Takahashi and A. Sancar (1998). "Role of Mouse Cryptochrome Blue-Light Photoreceptor in Circadian Photoresponses." Science **282**(5393): 1490-1494.
158. T. Todo (1999). "Functional Diversity of the DNA Photolyase/Blue Light Receptor Family." Mutat. Res. **434**(2): 89-97.
159. T. Todo, H. Takemori, H. Ryo, M. Ihara, T. Matsunega, O. Nikaido, K. Sato and T. Nomura (1993). "A new photoreactivating enzyme that specifically repairs ultraviolet light-induced (6-4)photoproducts." Nature **361**(6410): 371-374.
160. T. Torizawa, T. Ueda, S. Kuramitsu, K. Hitomi, T. Todo, S. Iwai, K. Morikawa and I. Shimada (2004). "Investigation Of The Cyclobutane Pyrimidine Dimer (CPD) Photolyase DNA Recognition Mechanism By NMR Analyses." J. Biol. Chem. **279**(31): 32950-32956.
161. E. Trushina and C. T. McMurray (2007). "Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Diseases." Neuroscience **145**(7): 1233-1248.
162. T. Ueda, A. Kato, S. Kuramitsu, H. Terasawa and I. Shimada (2005). "Identification and characterization of a second chromophore of DNA photolyase from *Thermus thermophilus* HB27." J Biol Chem.
163. A. Vagin and A. Teplyakov (1997). "Molrep - An Automated Program For Molecular Replacement." J Appl Cryst **30**: 1022-1025.
164. S. J. T. van Noort, F. Orsini, A. P. M. Eker, C. Wyman, J. de Grooth and J. Greve (1999). "DNA Bending by Photolyase in Specific and Non-Specific Complexes

- Studied by Atomic Force Microscopy." Nucleic Acids Res. **27**(19): 3875-3880.
165. B. J. Vande Berg and G. B. Sancar (1998). "Evidence for dinucleotide flipping by DNA photolyase." J. Biol. Chem. **273**(32): 20276-20284.
  166. D. G. Vassylyev, Y. Mikami, M. Ariyoshi, S. Iwai, E. Ohtsuka and K. Morikawa (1995). "Atomic model of a pyrimidine dimer excision repair enzyme complexed with a DNA substrate: Structural basis for damaged DNA recognition." Cell **83**: 773-782.
  167. J. Wagner, P. Gruz, S. Kim, M. Yamada, K. Matsui, R. P. P. Fuchs and T. Nohmi (1999). "The *dinB* Gene Encodes a Novel *E. coli* DNA Polymerase, DNA Pol IV, Involved in Mutagenesis." Mol. Cell **4**(2): 281-286.
  168. H. Wang, C. Saxena, D. Quan, A. Sancar and D. P. Zhong (2005). "Femtosecond Dynamics of Flavin Cofactor in DNA Photolyase: Radical Reduction, Local Solvation, and Charge Recombination." J. Phys. Chem. B **109**(4): 1329-1333.
  169. J. D. Watson and F. H. C. Crick (1953). "Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid." Nature **171**: 737-738.
  170. G. Weber (1950). "Fluorescence of riboflavin and flavin adenine dinucleotide." Biochem. J. **47**(1): 114-121.
  171. S. Weber (2005). "Light-Driven Enzymatic Catalysis of DNA Repair: A Review of Recent Biophysical Studies on Photolyase." Biochim. Biophys. Acta **1707**(1): 1-23.
  172. S. Weber, K. Möbius, G. Richter and C. W. M. Kay (2001). "The electronic structure of the flavin cofactor in DNA photolyase." J. Am. Chem. Soc. **123**: 3790-3798.
  173. C. J. Whitehouse, R. M. Taylor, A. Thistlethwaite, H. Zhang, F. Karimi-Busheri, D. D. Lasko, M. Weinfeld and K. W. Caldecott (2001). "XRCC1 Stimulates Human Polynucleotide Kinase Activity at Damaged DNA Termini and Accelerates DNA Single-Strand Break Repair." Cell **104**(1): 107-117.
  174. D. L. Wulff and C. S. Rupert (1962). "Disappearance of Thymine Photodimer in Ultraviolet Irradiated DNA Upon Treatment with a Photoreactivating Enzyme from Baker's Yeast." Biochem. Biophys. Res. Comm. **7**(3): 237-240.
  175. A. Yasui, A. P. Eker, S. Yasuhira, H. Yajima, T. Kobayashi, M. Takao and A. Oikawa (1994). "A New Class of DNA Photolyases Present in Various Organisms Including Aplacental Mammals." EMBO J. **13**(24): 6143-6151.
  176. Y.-H. You, D.-H. Lee, J.-H. Yoon, S. Nakajima, A. Yasui and G. P. Pfeifer (2001). "Cyclobutane Pyrimidine Dimers Are Responsible for the Vast Majority of Mutations Induced by UVB Irradiation in Mammalian Cells." J. Biol. Chem. **276**(48): 44688-44694.
  177. X. Zhao, J. Liu, D. S. Hsu, J.-S. Taylor and A. Sancar (1997). "Reaction Mechanism of (6-4) Photolyase." J. Mol. Biol. **272**(51): 32580-32590.

178. Y.-J. Zheng and R. L. Ornstein (1996). "A theoretical study of the structures of flavin in different oxidation and protonation states." J. Am. Chem. Soc. **118**: 9402-9408.

## 8. Anhang

### 8.1. Abkürzungen

$\lambda$	Wellenlänge
(k)Da	(kilo)Dalton
$\mu$	mikro
8-HDF	8-Hydroxy-7,8-didemethyl-5-deazariboflavin
8-IRF	8-Iodo-7,8-didemethyl-riboflavin
A	Adenin
Å	Ångström (= $10^{-10}$ m)
<i>A. nidulans</i>	<i>Anacystis nidulans</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
AM	Aufschlußmedium
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BER	Basenexcisionsreparatur
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
Cam <sup>n</sup>	Chloramphenicol ( $n \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
cis-Pt	cis-Platin
CPD	Cyclobutan Pyrimidin Dimer
C-terminal	carboxyterminal
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy Nucleotid Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB	Elutionspuffer
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EJ	<i>end joining</i>
eq	Äquivalent
Ex-Puffer	Extraktionspuffer
FAD	Flavinadenindinucleotid
FMN	Flavinmononucleotid
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
G	Guanin
g	Gramm /Erdbeschleunigung
h	Stunde
HEPES	N-[2-Hydroxyl]piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure]
HR	Homologe Reparatur
Hz	Hertz
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranosid
Kan <sup>n</sup>	Kanamycin ( $n \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
kb	Kilo-Basenpaar
LB-Medium	Luria Bertani Medium
m	Meter/Milli-
M	molar
min	Minute(n)
MMC	Mitomycin C
MMR	Fehlpaarungsreparatur ( <i>mismatch repair</i> )
MPD	MPD
MTHF	Methylen-Tetrahydrofolat
n	nano
NER	Nukleotidexcisionsreparatur
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
N-terminal	aminoterminal
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
Phl	Photolyase

PMSF	Phenylmethanolsulfonylfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
T	Thymin
<i>T. thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
T◊T	Thymin-Thymin-Dimer
Tab.	Tabelle
TB-Medium	Terrific Broth Medium
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	units
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen



Aminosäure	2-Buchstaben- Code	1-Buchstaben- Code	Molekulargewicht (g/mol)
Alanin	Ala	A	89
Arginin	Arg	R	174
Asparagin	Asn	N	132
Aspartat	Asp	D	133
Cystein	Cys	C	121
2,3-Diaminobutyrat	Dab		118
Glutamat	Glu	E	147
Glutamin	Gln	Q	146
Glycin	Gly	G	75
Histidin	His	H	155
Homoserin	Hse		119
Isoleucin	Ile	I	131
Leucin	Leu	L	131
Lysin	Lys	K	146
Methionin	Met	M	149
Ornithin	Orn	O	132
Phenylalanin	Phe	F	165
Prolin	Pro	P	115
Serin	Ser	S	105
Threonin	Thr	T	119
Tryptophan	Trp	W	204
Tyrosin	Tyr	Y	181
Valin	Val	V	117

**Tabelle 8.1:** Aminosäuren

## 8.2. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.1:</b> Bis zum Jahr 2007 veröffentlichte Röntgenkristallstrukturen von DNA-Photolyasen. (*) Die Vermutung der von Komori <i>et al.</i> postulierten Bindung von 8-HDF in <i>T. thermophilus</i> Photolyase konnte durch eigene röntgenkristallographische Arbeiten bestätigt werden [Klar, 2006].....	20
<b>Tabelle 1.2:</b> Bis zum Jahr 2007 veröffentlichte Röntgenkristallstrukturen von Cryptochromen. ....	25
<b>Tabelle 2.1:</b> Verwendete Geräte .....	30
<b>Tabelle 2.2:</b> Verwendete Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Enzyme.....	32
<b>Tabelle 4.1:</b> In dieser Arbeit röntgenkristallographisch untersuchte DNA Photolyasen und Cryptochrome .....	66
<b>Tabelle 4.2:</b> Für die Cokristallisation mit <i>A. nidulans</i> Photolyase eingesetztes 14mer Oligonukleotid mit CPD-Schaden und Gegenstrang. ....	67
<b>Tabelle 4.3:</b> Datensammlung und Verfeinerungsstatistik des CPD-DNA/Photolyase-Komplexes .....	70
<b>Tabelle 4.4:</b> Datensammlung und Verfeinerungsstatistik von nativem Cryptochrom 3: .....	77
<b>Tabelle 4.5:</b> Für die Cokristallisation mit <i>A. thaliana</i> Cryptochrome 3 eingesetztes 5mer Oligonukleotid mit CPD-Schaden. ....	78
<b>Tabelle 4.6:</b> Datensammlung und Verfeinerungsstatistik des CPD-DNA/Cryptochrom-Komplexes: .....	81
<b>Tabelle 4.7:</b> Mutagenese-Primer für die ortsspezifische Mutagenese zu R46E der <i>T. thermophilus</i> Photolyase. ....	83
<b>Tabelle 4.8:</b> Zusammensetzung einer Mutagenese-PCR.....	84
<b>Tabelle 4.9:</b> Native und artifizielle Flavinanaloga, die für die Inkorporierung in <i>T. thermophilus</i> Photolyase verwendet wurden. ....	96
<b>Tabelle 4.10:</b> Datensammlung und Verfeinerungsstatistik von Photolyase mit Flavinanaloga:.....	98
<b>Tabelle 8.1:</b> Aminosäuren.....	155
<b>Tabelle 8.2:</b> Hampton Crystal Screen.....	163
<b>Tabelle 8.3:</b> Hampton Crystal Screen Lite .....	165
<b>Tabelle 8.4:</b> Sigma Basic Screen .....	166
<b>Tabelle 8.5:</b> Sigma Extension Screen .....	167
<b>Tabelle 8.6:</b> Sigma Cryo Screen .....	168
<b>Tabelle 8.7:</b> Nextal Classic Suite.....	170
<b>Tabelle 8.8:</b> Nextal Classic Lite Suite .....	172
<b>Tabelle 8.9:</b> Nextal Anions Suite.....	174

### 8.3. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1:</b> Bildung der beiden primären UV-Schäden, dem <i>cis</i> , <i>syn</i> -Cyclobutanpyrimidindimer (CPD) und dem (6-4)Photoprodukt ((6-4)PP), aus zwei benachbarten Pyrimidinen. ....	7
<b>Abbildung 1.2:</b> DNA Schäden und Reparaturmechanismen. Typische Auslöser für DNA-Schädigungen (oben), Beispiele für durch diese ausgelöste DNA-Schäden (Mitte) und hauptverantwortlicher Reparaturmechanismus für die Beseitigung der Schäden (unten). Abbildung nach [Hoeijmakers, 2001]. ....	10
<b>Abbildung 1.3:</b> Mechanismus der Basenexcisionsreparatur (BER). Abbildung nach [Hoeijmakers, 2001]. ....	12
<b>Abbildung 1.5:</b> Phylogenetischer Stammbaum für Sequenzen aus der Photolyase/Cryptochrom Familie. Die <i>Anacystis nidulans</i> Photolyase sowie die <i>Arabidopsis thaliana</i> Cryptochrome Cry1, Cry2 und Cry3 sind hervorgehoben. Übernommen aus [Kleine, 2003]. ....	15
<b>Abbildung 1.4:</b> Strukturen der in Photolyasen gebundenen Cofaktoren. Das vollständig reduzierte FADH <sup>-</sup> dient als universeller katalytischer Cofaktor. Die beiden Antennenchromophore 8-HDF in der Deazaflavinklasse und MTHF in der Folatklasse der Photolyasen ermöglichen eine Erweiterung des Aktionsspektrums und erhöhen die Quantenausbeute der DNA-Reparatur (R = Glutamat). ....	16
<b>Abbildung 1.6:</b> Überlagerung der vier bekannten Photolyasestrukturen aus <i>E. coli</i> (pdb-code: 1DNP, gelb), <i>A. nidulans</i> (pdb-code: 1QNF, blau), <i>T. thermophilus</i> (pdb-code: 2J09, rot) und <i>S. tokodaii</i> (pdb-code: 2E0I, weiß). Die enthaltenen Cofaktoren sind ebenfalls in den entsprechenden Farben gekennzeichnet. ....	21
<b>Abbildung 1.7:</b> Modell der Cyclobutanpyrimidindimer-Reparatur durch zyklischen Elektronentransport in CPD-Photolyasen. Im Anschluß an die lichtunabhängige Bindung des Substrats wird ein UV- oder Blaulichtphoton vom Antennen-cofaktor absorbiert und dessen Anregungsenergie auf ein vollständig reduziertes FADH <sup>-</sup> mittels Fluoreszenzenergietransfer übertragen. Das angeregte *FADH <sup>-</sup> überträgt ein Elektron auf den Schaden, wodurch ein ladungsgetrenntes Radikalpaar entsteht. Durch die folgende Bindungsumbildung entstehen zwei Monomere als Produkt unter Elektronenrücktransfer auf das Flavinradikal und Regenerierung des katalytisch aktiven FADH <sup>-</sup> . Abbildung nach [Kavakli, 2004].	23
<b>Abbildung 2.1:</b> Verwendete Vektoren .....	33
<b>Abbildung 3.1:</b> Schematische Übersicht der einzelnen Teilschritte einer ortsspezifischen Mutagenese.....	45
<b>Abbildung 4.1:</b> Cokristalle von <i>A. nidulans</i> Photolyase mit doppelsträngigem CPD-haltigem 14mer DNA-Oligonukleotid. ....	68
<b>Abbildung 4.2:</b> Kristallpackung von Cokristallen aus <i>A. nidulans</i> Photolyase und CPD-DNA mit den vier Komplexen A-D. Die Komplexe A und B (grün) enthalten gebundene Duplex-DNA, Komplexe C und D (orange) weisen nur einzelsträngige DNA auf. ....	69
<b>Abbildung 4.3:</b> Kapillarelektrophoretische Untersuchungen an <i>A. nidulans</i>	

Photolyase/DNA-Cokristallen. **A)** Bei Cokristallen, die für 2 s Synchrotronbestrahlung ausgesetzt waren, liegt die Differenz der Retentionszeiten der beiden Peaks von CPD-Strang und Gegenstrang bei 2.1 min. **B)** Die Coinjektion von intaktem CPD-Schaden in Doppelstrang-DNA und einem *A. nidulans* Photolyase/DNA-Cokristall nach 2 s Synchrotronbestrahlung zeigt eine identische Zeitdifferenz von 2.1 min für die Retention von Gegenstrang und dem DNA-Strang mit intaktem CPD-Dimer....72

- Abbildung 4.4:** Kapillarelektrophoretische Untersuchung eines Photolyase/CPD-DNA-Cokristalls nach 1 h Belichtung bei 366 nm. Der DNA-Strang mit von *A. nidulans* Photolyase repariertem CPD-Dimer zeigt eine geringere Differenz der Retentionszeit zum Gegenstrang als der DNA-Strang mit intaktem CPD-Dimer. ....72
- Abbildung 4.5:** Kristall von *A. thaliana* Cryptochrom 3. Die Abmessungen betragen etwa 0.2 x 0.1 x 0.1 mm. ....74
- Abbildung 4.6:** Selbstrotationsfunktion eines *A. thaliana* Cryptochrom 3 Datensatzes bei einem Winkel von  $\chi = 180^\circ$ , berechnet mit Daten von 20.0-2.5 Å. Für die Berechnung wurde das Programm MOLREP verwendet. ....75
- Abbildung 4.7:** Monomer der Gesamtstruktur von *Arabidopsis thaliana* Cryptochrom 3. Die N-terminale Verlängerung ist grau, die restliche Antennendomäne blau, die FAD bindende Domäne rot und die beiden Cofaktoren sind gelb bzw. orange visualisiert. ....76
- Abbildung 4.8:** Cokristalle von *A. thaliana* Cryptochrom 3 mit pentamerer CPD-haltiger Einzelstrang-DNA. Die Abmessungen betragen etwa 0.2 x 0.1 x 0.1 mm. ....79
- Abbildung 4.9:** Darstellung des Inhalts der asymmetrischen Einheitszelle von Cokristallen aus *A. thaliana* Cryptochrom 3 und 5mer CPD-ssDNA mit den drei Dimeren der sechs Komplexe A bis F. ....80
- Abbildung 4.10:** Temperaturprofil der Mutagenese-PCR. ....83
- Abbildung 4.11:** konzentrierte *Thermus thermophilus* DNA-Photolyase ( $c \approx 20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). **A)** nativ **B)** R46E-Mutante. ....85
- Abbildung 4.12:** SDS-PAGE-Gele (12 %) der aufgereinigten **(A)** nativen und **(B)** R46E-Mutante von *Thermus thermophilus* DNA-Photolyase nach Gelfiltration mit Sephacryl S200-HR. ....86
- Abbildung 4.13:** UV/Vis-Absorptionsspektren von *T. thermophilus* Wildtyp (durchgezogene Linie) und R46E-Mutante (gepunktete Linie) Photolyase ( $c = 1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Der Ausschnitt zeigt das Differenzspektrum der beiden Absorptionsspektren. ....87
- Abbildung 4.14:** Glucoseoxidase-Referenzspektrum nach 32-minütiger Bestrahlung mit Weißlicht. ....89
- Abbildung 4.15:** Photoaktivierungsspektren von Wildtyp *T. thermophilus* Photolyase zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung mit Weißlicht ( $\lambda_{\text{max}} = 320 \text{ nm}$ ).90
- Abbildung 4.16:** Photoaktivierungsspektren der R46E-Mutante von *T. thermophilus* Photolyase zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung mit Weißlicht ( $\lambda_{\text{max}} = 320 \text{ nm}$ ). ....90
- Abbildung 4.17:** Photoaktivierungsspektren von Wildtyp (durchgezogene Linie) und R46E-Mutante (gepunktete Linie) der *T. thermophilus* Photolyase unter Bestrahlung

- mit Weißlicht nach 32 Minuten. Als Referenz ist das ebenfalls nach Bestrahlung aufgenommene Differenzabsorptionsspektrum der Glukoseoxidase im Reaktionspuffer ohne Photolyase (gestrichelte Linie) angegeben. .... 91
- Abbildung 4.18:** Photoaktivierungsspektren von Wildtyp *T. thermophilus* Photolyase zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung mit Blaulicht ( $\lambda_{\text{max}} = 447 \text{ nm}$ ). 92
- Abbildung 4.19:** Photoaktivierungsspektren der R46E-Mutante von *T. thermophilus* Photolyase zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung mit Blaulicht ( $\lambda_{\text{max}} = 447 \text{ nm}$ ). .... 92
- Abbildung 4.20:** Photoaktivierungsspektren von Wildtyp (durchgezogene Linie) und R46E-Mutante (gepunktete Linie) der *T. thermophilus* Photolyase unter Bestrahlung mit Blaulicht ( $\lambda = 447 \text{ nm}$ ) nach 32 Minuten. Als Referenz ist das Differenzabsorptionsspektrum einer identischen Probe der Wildtyp Photolyase vor der Bestrahlung (gestrichelte Linie) angegeben. .... 93
- Abbildung 4.21:** Reparaturaktivität von Wildtyp und R46E-Mutante der *T. thermophilus* Photolyase bei 370 nm und 447 nm. Die schwarzen Fehlerbalken geben die relative Standardabweichung an. .... 95
- Abbildung 5.1:** **A)** CPD-haltige Duplex-DNA gebunden an DNA-Photolyase (1TEZ) [Mees, 2004], T4 Endonuklease V (1VAS) [Vassilyev, 1995] oder unkomplexiert (1N4E) [Park, 2002]. **B)** Die Gesamtbiegung modellierter Duplex-DNA steigt von  $22^\circ$  (grau) auf etwa  $50^\circ$  bei Bindung an DNA-Photolyase (gelb). Abbildung nach [Mees, Klar, 2004]. .... 101
- Abbildung 5.2:** Bändermodell von Komplex A mit CPD-DNA (Stabmodell) und  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ -Dichte (konturiert bei  $1 \sigma$ ). Das Thymindimer ist blau dargestellt (Bezeichnungen des CPD-Strangs: blau; Gegenstrang: rot). Abgesehen vom Adeninrest des FAD (pink), sind die Cofaktoren gelb gekennzeichnet. Abbildung nach [Mees, Klar, 2004]. .... 102
- Abbildung 5.3:** Wechselwirkungen zwischen Gegenstrang und dem flexiblen Loop  $\alpha 6$  (grau) der Antennendomäne (rot) und dem verbrückenden Magnesiumion. H-Brücken mit der DNA sind orange, andere grau dargestellt. .... 104
- Abbildung 5.4:** Schematisches Diagramm der Interaktionen zwischen Duplex-DNA und Protein. Gepunktete Pfeile symbolisieren Wechselwirkungen mit dem Proteinrückgrat, durchgezogene Pfeile solche mit den Seitenketten. Die Nummerierung der Phosphatgruppen beginnt bei der Formacetalgruppe des Dimers (0). Abbildung nach [Mees, Klar, 2004]. .... 105
- Abbildung 5.5:** **A)** Um  $9^\circ$  gebogener Isoalloxazinrest des FADH in der katalytischen Region des DNA/Photolyase-Komplexes konturiert bei einer  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ -Dichte von  $1 \sigma$ . Der Rest des nicht mit DNA komplexierten Proteins (pdb-code: 1QNF) ist in hellrot dünn dargestellt. **B)** Modellierung des intakten CPD-Schadens im aktiven Zentrum (pink), die Differenzelektronendichte bei den Atomen C5 und C6 des Cyclobutanrings (rot:  $-3\sigma$ , blau:  $+3\sigma$ ) zeigt eindeutig die Spaltung des Dimers. Der reparierte Schaden ist mit der dazugehörigen  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ -Dichte bei  $1 \sigma$  grau dargestellt. **C)** Stereoabbildung der Wechselwirkungen des CPD-Schadens mit den Aminosäureresten im aktiven Zentrum. Abbildung nach [Mees, Klar, 2004]. 107
- Abbildung 5.6:** Wechselwirkungen zwischen CPD-Schaden und Aminosäureresten der Bindungstasche (entsprechende Reste von *A. thaliana* Cryptochrom 3 sind in

Klammern angegeben, siehe Kapitel 5.4.2). Mögliche Elektronentransferwege kommen über den Adeninrest des FAD (violett) oder über den Isoalloxazinring und das 3'-Thymin (orange) zustande. Abbildung nach [Mees, Klar, 2004].....109

- Abbildung 5.7:** Gesamtübersicht der Komplexstruktur von *A. nidulans* Photolyase mit repariertem, einzelsträngigem CPD-Schaden (grün) in der Antennenregion (blau) des Enzyms [Essen, 2006a]. Abgesehen vom Adeninrest (pink) in der FAD-bindenden Domäne (grau) sind die beiden Cofaktoren FAD und 8-HDF gelb gekennzeichnet.....113
- Abbildung 5.8:** katalytisch aktive Antennenregion von *A. nidulans* Photolyase mit gebundenem und repariertem CPD-Schaden in einzelsträngiger DNA (grün). Wichtige Aminosäurereste sind grau, die beiden Flavincofaktoren (FAD, 8-HDF) gelb dargestellt. ....114
- Abbildung 5.9:** üblicher und alternativer Elektronenübertragungsweg in *A. nidulans* Photolyase. **A)** Vom Antennencofaktor 8-HDF über das katalytisch aktive FADH<sup>-</sup> auf den CPD-Schaden. **B)** Vom vollständig reduzierten FADH<sup>-</sup> über den Antennencofaktor 8-HDF auf den CPD-Schaden.....115
- Abbildung 5.10:** Vergleich der elektrostatischen Oberflächen in den FAD-Bindungsregionen von *Arabidopsis thaliana* Cry1 (pdb-code: 1U3C) und Cry3 (pdb-code: 2J4D) sowie *Synechocystis sp.* CryDASH (pdb-code: 1NP7), berechnet mit dem Programm APBS [Baker, 2001] bei einer Ionenstärke von 0.1 M (blau: -7 kcal·e<sup>-1</sup>, weiß: 0 kcal·e<sup>-1</sup>, rot: +7 kcal·e<sup>-1</sup>, 0.1 M Salz). Abbildung nach [Klar, 2007]. 116
- Abbildung 5.11:** FAD-Bindung und mögliche Elektronentransferwege in *A. thaliana* Cry3. An konservierten Elektronentransferwegen beteiligte Reste sind violett, die an einem alternativen Weg beteiligten Tyrosine sind rot markiert. Abbildung nach [Klar, 2007].....118
- Abbildung 5.12:** N-terminale und C-terminale Verlängerungen von *Arabidopsis thaliana* Cry1, Cry2 und Cry3. Abbildung nach [Klar, 2007]. ....119
- Abbildung 5.13:** **A)** Struktur des DAS-Motivs aus *A. thaliana* Cry3. **B)** Sequenzalignment der DAS-Motive. Abbildung nach [Klar, 2007].....120
- Abbildung 5.14:** Elektrostatische Oberflächendarstellung der MTHF-Bindungsregionen von *A. thaliana* Cry3 bzw. *E. coli* Photolyase, berechnet mit dem Programm APBS [Baker, 2001] bei einer Ionenstärke von 0.1 M (blau: -7 kcal·e<sup>-1</sup>, weiß: 0 kcal·e<sup>-1</sup>, rot: +7 kcal·e<sup>-1</sup>). Abbildung nach [Klar, 2007]. ....121
- Abbildung 5.15:** **A)** Stereoabbildung der MTHF-Bindung in *A. thaliana* Cry3. **B)** Schema der Wechselwirkungen von MTHF mit der Cry3 Proteinumgebung. **C)** Wechselwirkungen der MTHF-Bindung in *E. coli* Photolyase. Abbildung nach [Klar, 2007]. ....122
- Abbildung 5.16:** **A)** Absorptionsspektren von Wildtyp und E149A-Mutante aus *A. thaliana* Cry3. Die Vergrößerung zeigt den für die semichinoide Spezies charakteristischen Bereich. **B)** Fluoreszenzanregungsspektrum (gepunktete Linien) und -emissionsspektrum (durchgezogene Linien) des bei pH = 2.0 von Cry3-E149A freigesetzten Cofaktors. **C)** Fluoreszenzemissionsspektrum ( $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$ ) von Cry3-E149A bei pH = 2.0 und nach pH-Wert-Änderung auf 10.0 im Anschluss aufgenommenes Spektrum. Abbildung nach [Klar, 2007]. 124
- Abbildung 5.17:** Veränderungen der Absorptionsspektren bei kontinuierlicher Bestrahlung

- von *A. thaliana* Cry 3 Wildtyp und E149A-Mutante mit **A**) Blaulicht ( $\lambda = 450$  nm) oder **B**) UV-A-Licht ( $\lambda = 383$  nm). Abbildung nach [Klar, 2007]. ..... 125
- Abbildung 5.18:** Bändermodell von Komplex A und  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ -Dichte (konturiert bei  $1 \sigma$ ). Die katalytische Domäne von *A. thaliana* Cryptochrom 3 ist dunkelrot, die Antennendomäne blau dargestellt. Besonders markiert sind weiterhin die  $\alpha 5$ -Helix (hellrot) und die N-terminale Verlängerung (grau). Die gebundene DNA ist grün dargestellt. Abgesehen vom Adeninrest des FAD (pink) sind die Cofaktoren gelb gekennzeichnet. Die Bezeichnungen der Sekundärstrukturelemente sind von *Synechocystis* sp. PCC6803 CryDASH (pdb-code: 1NP7) übernommen [Brudler, 2003]. ..... 127
- Abbildung 5.19:** Strukturelle Verschiebungen innerhalb des aktiven Zentrums bei der Bindung CPD-haltiger einzelsträngiger DNA an *A. thaliana* Cryptochrom 3. Die Aminosäuren des freien Enzyms (pdb-code: 2J4D) sind grün, Cryptochrom 3 mit gebundener DNA violett, enthaltene Cofaktoren gelb und die DNA weiß dargestellt (Stäbchenmodell). ..... 128
- Abbildung 5.20:** Stereodiagramm der Antennenbindungsstelle. Dargestellt ist der Vergleich von in *T. thermophilus* Photolyase gebundenem 8-HDF (violett, Proteinumgebung: orange) mit *A. nidulans* Photolyase (hellblau). Zur Veranschaulichung ist zusätzlich das in *T. thermophilus* Holophotolyase vorhandene FMN eingezeichnet (gelb). Abbildung nach [Klar, 2006]. ..... 132
- Abbildung 5.21:** Elektrostatische Oberflächendarstellung der *Thermus thermophilus* Holophotolyase, berechnet mit dem Programm APBS [Baker, 2001] bei einer Ionenstärke von 0.1 M (blau:  $+5 \text{ kcal} \cdot \text{e}^{-1}$ , weiß:  $0 \text{ kcal} \cdot \text{e}^{-1}$ , rot:  $-5 \text{ kcal} \cdot \text{e}^{-1}$ ). Die obere Abbildung zeigt die Bindungsregion von N-terminaler und katalytischer Domäne mit der gebundenen FMN-Antenne. Die untere Abbildung präsentiert die basische DNA-Bindungsstelle der Photolyase mit dem zentral angeordneten FAD-Cofaktor. Abbildung nach [Klar, 2006]. ..... 133
- Abbildung 5.22:** A) Diagramm der Wechselwirkungen zwischen FMN und umgebenden Aminosäuren. B) Überlagerung von FMN (grün), 8-HDF (violett) und 8-IRF (blau) in der Antennenbindungsstelle. Abbildung nach [Klar, 2006]. ..... 134
- Abbildung 5.23:** Flavinbindung in der Antennenchromophorbindungsstelle von *Thermus thermophilus*. Die Flavine **A**) FMN und **B**) 8-HDF sind grün, die Proteinumgebung gelb dargestellt. Die Differenzelektronendichte  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  ist bei einem Konturierungsgrad von  $3 \sigma$  veranschaulicht. Abbildung nach [Klar, 2006]. ..... 135
- Abbildung 5.24:** Bindung von 8-IRF in der Antennenchromophorbindungsstelle von *Thermus thermophilus*. Das Flavin ist grün, die Proteinumgebung gelb dargestellt. Die Differenzelektronen-dichte  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  ist bei einem Konturierungsgrad von  $3 \sigma$  veranschaulicht. Abbildung nach [Klar, 2006]. .... 135

## 8.4. Kristallisationsscreens

### 8.4.1. Hampton Crystal Screen

Nr.	Salz	Puffer	Präzipitans
1	Ca Cl *2H <sub>2</sub> O 0.02M	Na acetat *3H <sub>2</sub> O (pH 4.6) 0.1M	(+/-)-MPD 30%
2			K Na tartrat *4H <sub>2</sub> O 0.4M
3			NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.4M
4		Tris HCl (pH 8.5) 0.1M	NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> 2M
5	Na citrat tribasisch *2H <sub>2</sub> O 0.2M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	(+/-)-MPD 30%
6	Mg Cl *6H <sub>2</sub> O 0.2M	Tris HCl (pH 8.5) 0.1M	PEG 4,000 30%
7		Na cacodylat *3H <sub>2</sub> O (pH 6.5) 0.1M	Na acetat *3H <sub>2</sub> O 1.4M
8	Na citrat tribasisch *2H <sub>2</sub> O 0.2M	Na cacodylat *3H <sub>2</sub> O (pH 6.5) 0.1M	2-Propanol 30%
9	NH <sub>4</sub> acetat 0.2M	Na citrat tribasisch *2H <sub>2</sub> O (pH 5.6) 0.1M	PEG 4,000 30%
10	NH <sub>4</sub> acetat 0.2M	Na acetat *3H <sub>2</sub> O (pH 4.6) 0.1M	PEG 4,000 30%
11		Na citrat tribasisch *2H <sub>2</sub> O (pH 5.6) 0.1M	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1M
12	Mg Cl *6H <sub>2</sub> O 0.2M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	2-Propanol 30%
13	Na citrat tribasisch *2H <sub>2</sub> O 0.2M	Tris HCl (pH 8.5) 0.1M	PEG 400 30%
14	Ca Cl *2H <sub>2</sub> O 0.2M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	PEG 400 28%
15	NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> 0.2M	Na cacodylat *3H <sub>2</sub> O (pH 6.5) 0.1M	PEG 8,000 30%
16		HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	Li SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O 1.5M
17	Li SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O 0.2M	Tris HCl (pH 8.5) 0.1M	PEG 4,000 30%
18	Mg acetat *4H <sub>2</sub> O 0.2M	Na cacodylat *3H <sub>2</sub> O (pH 6.5) 0.1M	PEG 8,000 20%
19	NH <sub>4</sub> acetat 0.2M	Tris HCl (pH 8.5) 0.1M	2-Propanol 30%
20	NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> 0.2M	Na acetat *3H <sub>2</sub> O (pH 4.6) 0.1M	PEG 4,000 25%
21	Mg acetat *4H <sub>2</sub> O 0.2M	Na cacodylat *3H <sub>2</sub> O (pH 6.5) 0.1M	(+/-)-MPD 30%
22	Na acetat *3H <sub>2</sub> O 0.2M	Tris HCl (pH 8.5) 0.1M	PEG 4,000 30%
23	Mg Cl *6H <sub>2</sub> O 0.2M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	PEG 400 30%
24	Ca Cl *2H <sub>2</sub> O 0.2M	Na acetat *3H <sub>2</sub> O (pH 4.6) 0.1M	2-Propanol 20%
25		Imidazol (pH 6.5) 0.1M	Na acetat *3H <sub>2</sub> O 1M
26	NH <sub>4</sub> acetat 0.2M	Na citrat tribasisch *2H <sub>2</sub> O (pH 5.6) 0.1M	(+/-)-MPD 30%
27	Na citrat tribasisch *2H <sub>2</sub> O 0.2M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	2-Propanol 20%
28	Na acetat *3H <sub>2</sub> O 0.2M	Na cacodylat *3H <sub>2</sub> O (pH 6.5) 0.1M	PEG 8,000 30%
29		HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	K Na tartrat *4H <sub>2</sub> O 0.8M
30	NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> 0.2M		PEG 8,000 30%
31	NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> 0.2M		PEG 4,000 30%
32			NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> 2M
33			Na formate 4M
34		Na acetat *3H <sub>2</sub> O (pH 4.6) 0.1M	Na formate 2M
35		HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O 0.8M, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.8M
36		Tris HCl (pH 8.5) 0.1M	PEG 8,000 8%
37		Na acetat *3H <sub>2</sub> O (pH 4.6) 0.1M	PEG 4,000 8%
38		HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	Na citrat tribasisch *2H <sub>2</sub> O 1.4M
39		HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	PEG 400 2%, NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> 2M
40		Na citrat tribasisch *2H <sub>2</sub> O (pH 5.6) 0.1M	2-Propanol 20%, PEG 4,000 20%
41		HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	2-Propanol 10%, PEG 4,000 20%
42	K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.05M		PEG 8,000 20%



43			PEG 1500 30%
44			Mg formiat *2H2O 0.2M
45	Zi acetat *2H2O 0.2M	Na cacodylat *3H2O (pH 6.5) 0.1M	PEG 8,000 18%
46	Ca acetat *H2O 0.2M	Na cacodylat *3H2O (pH 6.5) 0.1M	PEG 8,000 18%
47		Na acetat *3H2O (pH 4.6) 0.1M	NH4 SO4 2M
48		Tris HCl (pH 8.5) 0.1M	NH4 H2PO4 2M
49	Li SO4 H2O 1M		PEG 8,000 2%
50	Li SO4 H2O 0.5M		PEG 8,000 15%

**Tabelle 8.2:** Hampton Crystal Screen

## 8.4.2. Hampton Crystal Screen Lite

Nr.	Salz	Puffer	Präzipitans
1	Ca Cl *2H2O 0.02M	Na acetat *3H2O (pH 4.6) 0.1M	MPD 15%
2			K Na tartrat *4H2O 0.2M
3			NH4 H2PO4 0.2M
4		Tris HCl (pH 8.5) 0.1M	NH4 SO4 1M
5	tri-Na citrat *2H2O 0.2M	Na HEPES (pH 7.5) 0.1M	MPD 15%
6	Mg Cl *6H2O 0.2M	Tris HCl (pH 8.5) 0.1M	PEG 4000 15%
7		Na cacodylat (pH 6.5) 0.1M	Na acetat *3H2O 0.7M
8	tri-Na citrat *2H2O 0.2M	Na cacodylat (pH 6.5) 0.1M	2-Propanol 15%
9	NH4 acetat 0.2M	tri-Na citrat *2H2O (pH 5.6) 0.1M	PEG 4000 15%
10	NH4 acetat 0.2M	Na acetat *3H2O (pH 4.6) 0.1M	PEG 4000 15%
11		tri-Na citrat *2H2O (pH 5.6) 0.1M	NH4 H2PO4 0.5M
12	Mg Cl *6H2O 0.2M	Na HEPES (pH 7.5) 0.1M	2-Propanol 15%
13	tri-Na citrat *2H2O 0.2M	Tris HCl (pH 8.5) 0.1M	PEG 400 15%
14	Ca Cl *2H2O 0.2M	Na HEPES (pH 7.5) 0.1M	PEG 400 14%
15	NH4 SO4 0.2M	Na cacodylat (pH 6.5) 0.1M	PEG 8000 15%
16		Na HEPES (pH 7.5) 0.1M	Li SO4 H2O 0.75M
17	Li SO4 H2O 0.2M	Tris HCl (pH 8.5) 0.1M	PEG 4000 15%
18	Mg acetat *4H2O 0.2M	Na cacodylat (pH 6.5) 0.1M	PEG 8000 10%
19	NH4 acetat 0.2M	Tris HCl (pH 8.5) 0.1M	2-Propanol 15%
20	NH4 SO4 0.2M	Na acetat *3H2O (pH 4.6) 0.1M	PEG 4000 12.5%
21	Mg acetat *4H2O 0.2M	Na cacodylat (pH 6.5) 0.1M	MPD 15%
22	Na acetat *3H2O 0.2M	Tris HCl (pH 8.5) 0.1M	PEG 4000 15%
23	Mg Cl *6H2O 0.2M	Na HEPES (pH 7.5) 0.1M	PEG 400 15%
24	Ca Cl *2H2O 0.2M	Na acetat *3H2O (pH 4.6) 0.1M	2-Propanol 10%
25		Imidazol (pH 6.5) 0.1M	Na acetat *3H2O 0.5M
26	NH4 acetat 0.2M	tri-Na citrat *2H2O (pH 5.6) 0.1M	MPD 15%
27	tri-Na citrat *2H2O 0.2M	Na HEPES (pH 7.5) 0.1M	2-Propanol 10%
28	Na acetat *3H2O 0.2M	Na cacodylat (pH 6.5) 0.1M	PEG 8000 15%
29		Na HEPES (pH 7.5) 0.1M	K Na tartrat *4H2O 0.4M
30	NH4 SO4 0.2M		PEG 8000 15%
31	NH4 SO4 0.2M		PEG 4000 15%
32			NH4 SO4 1M
33			Na formiat 2M
34		Na acetat *3H2O (pH 4.6) 0.1M	Na formiat 1M
35		Na HEPES (pH 7.5) 0.1M	NaH2PO4 0.4M, KH2PO4 0.4M
36		Tris HCl (pH 8.5) 0.1M	PEG 8000 4%
37		Na acetat *3H2O (pH 4.6) 0.1M	PEG 4000 4%
38		Na HEPES (pH 7.5) 0.1M	tri-Na citrat *2H2O 0.7M
39		Na HEPES (pH 7.5) 0.1M	PEG 400 2%, NH4 SO4 1M
40		tri-Na citrat *2H2O (pH 5.6) 0.1M	Isopropanol 10%, PEG 4000 10%
41		Na HEPES (pH 7.5) 0.1M	Isopropanol 5%, PEG 4000 10%
42	K H2PO4 0.05M		PEG 8000 10%
43			PEG 1500 15%
44			Mg formiat 0.1M
45	Zi acetat *2H2O 0.2M	Na cacodylat (pH 6.5) 0.1M	PEG 8000 9%

46	Ca acetat H <sub>2</sub> O 0.2M	Na cacodylat (pH 6.5) 0.1M	PEG 8000 9%
47		Na acetat *3H <sub>2</sub> O (pH 4.6) 0.1M	NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> 1M
48		Tris HCl (pH 8.5) 0.1M	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1M
49	Li SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O 0.5M		PEG 8000 2%
50	Li SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O 0.5M		PEG 8000 7.5%

**Tabelle 8.3:** Hampton Crystal Screen Lite

## 8.4.3. Sigma Basic Screen

Nr.	Salz	Puffer	Präzipitans
1	Ca-Cl 0.02M	Na-acetat (pH 4.6) 0.1M	MPD 30%
2	K-,Na-tartrat 0.4M		
3	NH <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.4M		
4	NH <sub>4</sub> -SO <sub>4</sub> 2.0M	TRIS-HCl (pH 8.5) 0.1M	
5	Na-citrat 0.2M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	MPD 30%
6	Mg-Cl 0.2M	TRIS-HCl (pH 8.5) 0.1M	PEG 4000 30%
7	Na-acetat 1.4M	Na-cacodylat (pH 6.5) 0.1M	
8	Na-citrat 0.2M	Na-cacodylat (pH 6.5) 0.1M	2-Propanol 30%
9	NH <sub>4</sub> -acetat 0.2M	Na-citrat (pH 5.6) 0.1M	PEG 4000 30%
10	NH <sub>4</sub> -acetat 0.2M	Na-acetat (pH 4.6) 0.1M	PEG 4000 30%
11	NH <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.0M	Na-citrat (pH 5.6) 0.1M	
12	Mg-Cl 0.2M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	2-Propanol 30%
13	Na-citrat 0.2M	TRIS-HCl (pH 8.5) 0.1M	PEG 400 30%
14	Ca-Cl 0.2M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	PEG 400 28%
15	NH <sub>4</sub> -SO <sub>4</sub> 0.2M	Na-cacodylat (pH 6.5) 0.1M	PEG 8000 30%
16	Li-SO <sub>4</sub> 1.5M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	
17	Li-SO <sub>4</sub> 0.2M	TRIS-HCl (pH 8.5) 0.1M	PEG 4000 30%
18	Mg-acetat 0.2M	Na-cacodylat pH (6.5) 0.1M	PEG 8000 20%
19	NH <sub>4</sub> -acetat 0.2M	TRIS-HCl (pH 8.5) 0.1M	2-Propanol 30%
20	NH <sub>4</sub> -SO <sub>4</sub> 0.2M	Na-acetat (pH 4.6) 0.1M	PEG 4000 25%
21	Mg-acetat 0.2M	Na-cacodylat (pH 6.5) 0.1M	MPD 30%
22	Na-acetat 0.2M	TRIS-HCl (pH 8.5) 0.1M	PEG 4000 30%
23	Mg-Cl 0.2M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	PEG 400 30%
24	Ca-Cl 0.2M	Na-acetat (pH 4.6) 0.1M	2-Propanol 20%
25	Na-acetat 1M	Imidazol (pH 6.5) 0.1M	
26	NH <sub>4</sub> -acetat 0.2M	Na-citrat (pH 5.6) 0.1M	MPD 30%
27	Na-citrat 0.2M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	2-Propanol 20%
28	Na-acetat 0.2M	Na-cacodylat pH (6.5) 0.1M	PEG 8000 30%
29	K-,Na-tartrat 0.8M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	
30	NH <sub>4</sub> -SO <sub>4</sub> 0.2M		PEG 8000 30%
31	NH <sub>4</sub> -SO <sub>4</sub> 0.2M		PEG 4000 30%
32	NH <sub>4</sub> -SO <sub>4</sub> 2M		
33	Na-formiate 4M		
34	Na-formiate 2M	Na-acetat (pH 4.6) 0.1M	
35		HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	
36	K-H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.8M, Na-H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.8M		
37		Na-acetat (pH 4.6) 0.1M	PEG 4000 8%
38	Na-citrat 1.4M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	
39	NH <sub>4</sub> -SO <sub>4</sub> 2.0M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	PEG 400 2%
40		Na-citrat (pH 5.6) 0.1M	2-PrOH 20%, PEG4000 20%
41		HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	2-PrOH 10%, PEG4000 20%
42	K-H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.05M		PEG 8000 20%
43			PEG 1500 30%
44			Mg-formiate 0.2M
45	Zn-acetat 0.2M	Na-cacodylat (pH 6.5) 0.1M	PEG 8000 18%
46	Ca-acetat 0.2M	Na-cacodylat (pH 6.5) 0.1M	PEG 8000 18%
47	NH <sub>4</sub> -SO <sub>4</sub> 2.0M	Na-acetat (pH 4.6) 0.1M	
48	NH <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2.0M	TRIS-HCl (pH 8.5) 0.1M	
49	Li-SO <sub>4</sub> 1.0M		PEG 8000 2%
50	Li-SO <sub>4</sub> 0.5M		PEG 8000 15%

Tabelle 8.4: Sigma Basic Screen

## 8.4.4. Sigma Extension Screen

Nr.	Salz	Puffer	Präzipitans
1	Na-Cl 2M		PEG 6000 10%
2	Na-Cl 0.5M, Mg-Cl 0.01M		CTAB 0.01M
3			Ethylenglycol 25%
4			Dioxane 35%
5	NH <sub>4</sub> -SO <sub>4</sub> 2M		2-Propanol 5%
6		Imidazol (pH 7.0) 1M	
7			
8	Na-Cl 1.5M		PEG 1000 10%, PEG 8000 10%
9	Na-Cl 2M	Na-acetat (pH 4.6) 0.1M	Ethanol 10%
10	Na-Cl 0.2M	Na-acetat (pH 4.6) 0.1M	
11	Co-Cl 0.01M	Na-acetat (pH 4.6) 0.1M	MPD 30%
12	Cd-Cl 0.1M	Na-acetat (pH 4.6) 0.1M	1,6-Hexandiol 1M
13	NH <sub>4</sub> -SO <sub>4</sub> 0.2M	Na-acetat (pH 4.6) 0.1M	PEG 400 30%
14	K-,Na-tartrat 0.2M, NH <sub>4</sub> -SO <sub>4</sub> 2M	Na-citrat (pH 5.6) 0.1M	PEG MME 2000 30%
15	Li-SO <sub>4</sub> 1M, NH <sub>4</sub> -SO <sub>4</sub> 0.5M	Na-citrat (pH 5.6) 0.1M	
16	Na-Cl 0.5M	Na-citrat (pH 5.6) 0.1M	Polyethylenimin 2%
17		Na-citrat (pH 5.6) 0.1M	tert.-Butanol 35%
18	Fe(III)-Cl 0.01M	Na-citrat (pH 5.6) 0.1M	Jeffamine M-600 10%
19		Na-citrat (pH 5.6) 0.1M	1,6-Hexandiol 2.5M
20	Mg-SO <sub>4</sub> 1.6M	MES (pH 6.5) 0.1M	
21	Na-Cl 2M, Ka-,Na- H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> each 0.1M		MES (pH 6.5) 0.1M
22		MES (pH 6.5) 0.1M	PEG 20'000 12%
23	NH <sub>4</sub> -SO <sub>4</sub> 1.6M	MES (pH 6.5) 0.1M	Dioxan 10%
24	Cs-Cl 0.05M	MES (pH 6.5) 0.1M	Jeffamine M-600 30%
25	Co-Cl 0.01M, NH <sub>4</sub> -SO <sub>4</sub> 1.8M	MES (pH 6.5) 0.1M	
26	NH <sub>4</sub> -SO <sub>4</sub> 0.2M	MES (pH 6.5) 0.1M	PEG MME 5000 30%
27	Zn-SO <sub>4</sub> 0.01M	MES (pH 6.5) 0.1M	PEG MME 550 25%
28		Na-citrat (pH 6.5) 1.6M	
29	NH <sub>4</sub> -SO <sub>4</sub> 0.5M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	MPD 30%
30		HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	MPD 5%, PEG6000 10%
31		HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	Jeffamine M-600 20%
32	NH <sub>4</sub> -SO <sub>4</sub> 1.6M, Na-Cl 0.1M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	
33	NH <sub>4</sub> -formiat 2.0M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	
34	Na-acetat 1.0M, Cd-SO <sub>4</sub> 0.05M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	
35		HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	MPD 70%
36	Na-Cl 4.3M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	
37		HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	Ethylenglycol 8%, PEG8000 10%
38		HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	PEG 10'000 20%
39	Mg-Cl 0.2M	TRIS-HCl (pH 8.5) 0.1M	1,6-Hexandiol 3.4M
40		TRIS-HCl (pH 8.5) 0.1M	tert.-Butanol 25%
41	Li-SO <sub>4</sub> 1M, Ni(II)-Cl 0.01M	TRIS-HCl (pH 8.5) 0.1M	
42	NH <sub>4</sub> -SO <sub>4</sub> 1.5M	TRIS-HCl (pH 8.5) 0.1M	Glycerin 12%
43	NH <sub>4</sub> -PO <sub>4</sub> 0.2M	TRIS-HCl (pH 8.5) 0.1M	MPD 50%
44		TRIS-HCl (pH 8.5) 0.1M	Ethanol 20%
45	Ni(II)-Cl 0.01M	TRIS-HCl (pH 8.5) 0.1M	PEG MME 2000 20%
46	Na-Cl 0.1M	Bicine (pH 9.0) 0.1M	PEG MME 550 20%
47	Mg-Cl 2M	Bicine (pH 7.5) 0.1M	
48		Bicine (pH 9.0) 0.1M	Dioxan 2%, PEG 20'000 10%
49	Mg-Cl 0.1 M	TRIS-HCl (pH 8.5) 0.1M	PEG 20000 15%
50			PEG 20000 20 %

Tabelle 8.5: Sigma Extension Screen

## 8.4.5. Sigma Cryo Screen

Nr.	Salz	Puffer	Präzipitans
1	Ca-Cl 0.02M	Na-acetat (pH 4.3) 0.1M	MPD 30%
2	K-,Na-tartrat 0.26M		Glycerin 35%
3	NH <sub>4</sub> -PO <sub>4</sub> 0.26M		Glycerin 35%
4	NH <sub>4</sub> -SO <sub>4</sub> 1.5M	TRIS-HCl (pH 8.5) 0.075M	Glycerin 25%
5	Na-citrat 0.2M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	MPD 30%
6	Mg-Cl 0.16M	TRIS-HCl (pH 8.5) 0.08M	PEG 4000 24%, Glycerin 20%
7	Na-acetat 0.98M	Na-cacodylat (pH 6.5) 0.07M	Glycerin 30%
8	Na-citrat 0.14M	Na-cacodylat (pH 6.5) 0.07M	2-Propanol 21%, Glycerin 30%
9	NH <sub>4</sub> -acetat 0.17M	Na-citrat (pH 5.6) 0.085M	PEG 4000 25.5%, Glycerin 15%
10	NH <sub>4</sub> -acetat 0.17M	Na-acetat (pH 4.6) 0.085M	PEG 4000 25.5%, Glycerin 15%
11	NH <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.7M	Na-citrat (pH 5.6) 0.07M	Glycerin 30%
12	Mg-Cl 0.18M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.09M	2-Propanol 27%, Glycerin 10%
13	Na-citrat 0.2M	TRIS-HCl (pH 8.5) 0.1M	PEG 400 30%
14	Ca-Cl 0.19M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.095M	PEG 400 26.6%, Glycerin 5%
15	NH <sub>4</sub> -SO <sub>4</sub> 0.17M	Na-cacodylat (pH 6.5) 0.085M	PEG 8000 25.5%, Glycerin 15%
16	Li-SO <sub>4</sub> 1.125M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.075M	Glycerin 25%
17	Li-SO <sub>4</sub> 0.17M	TRIS-HCl (pH 8.5) 0.085M	PEG 4000 25.5%, Glycerin 15%
18	Mg-acetat 0.16M	Na-cacodylat (pH 6.5) 0.08M	PEG 8000 16%, Glycerin 20%
19	NH <sub>4</sub> -acetat 0.16M	TRIS-HCl (pH 8.5) 0.08M	2-Propanol 24%, Glycerin 20%
20	NH <sub>4</sub> -SO <sub>4</sub> 0.16M	Na-acetat (pH 4.6) 0.08M	PEG 4000 20%, Glycerin 20%
21	Mg-acetat 0.2M	Na-cacodylat (pH 6.5) 0.1M	MPD 30%
22	Na-acetat 0.17M	TRIS-HCl (pH 8.5) 0.085M	PEG 4000 25.5%, Glycerin 15%
23	Mg-Cl 0.2M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.1M	PEG 400 30%
24	Ca-Cl 0.14M	Na-acetat (pH 4.6) 0.07M	2-Propanol 14%, Glycerin 30%
25	Na-acetat 0.7M	Imidazol (pH 6.5) 0.07M	Glycerin 30%
26	NH <sub>4</sub> -acetat 0.2M	Na-citrat (pH 5.6) 0.1M	MPD 30%
27	Na-citrat 0.14M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.07M	2-Propanol 14%, Glycerin 30%
28	Na-acetat 0.17M	Na-cacodylat (pH 6.5) 0.085M	PEG 8000 25.5%, Glycerin 15%
29	K-,Na-tartrat 0.52M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.065M	Glycerin 35%
30	NH <sub>4</sub> -SO <sub>4</sub> 0.17M		PEG 8000 25.5%, Glycerin 15%
31	NH <sub>4</sub> -SO <sub>4</sub> 0.17M		PEG 4000 25.5%, Glycerin 15%
32	NH <sub>4</sub> -SO <sub>4</sub> 1.5M		Glycerin 25%
33	Na-formiat 3.6M		Glycerin 10%
34	Na-formiat 1.4M	Na-acetat (pH 4.6) 0.07M	Glycerin 30%
35	Na-,K-H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> each 0.6M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.075M	Glycerin 25%
36		TRIS-HCl (pH 8.5) 0.065M	PEG 8000 5.2%, Glycerin 35%
37		Na-acetat (pH 4.6) 0.07M	PEG 4000 5.6%, Glycerin 30%
38	Na-citrat 1.26M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.09M	Glycerin 10%
39	NH <sub>4</sub> -SO <sub>4</sub> 1.7M	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.085M	PEG 400 1.7%, Glycerin 15%
40		Na-citrat (pH 5.6) 0.095M	2-Propanol 19%, PEG 4000 19%, Glycerin 5%
41			Propanol 8.5%, PEG 4000 17%, Glycerin 15%
42	K-H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.04M		PEG 8000 16%, Glycerin 20%
43			PEG 1500 24%, Glycerin 20%
44	Mg-formiat 0.1M		Glycerin 50%
45	Zn-acetat 0.16M	Na-cacodylat (pH 6.5) 0.08M	PEG 8000 14.4%, Glycerin 20%
46	Ca-acetat 0.16M	Na-cacodylat (pH 6.5) 0.08M	PEG 8000 14.4%, Glycerin 20%
47	NH <sub>4</sub> -SO <sub>4</sub> 1.6M	Na-acetat (pH 4.6) 0.08M	Glycerin 20%
48	NH <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.6M	TRIS-HCl (pH 8.5) 0.08M	Glycerin 20%
49	Li-SO <sub>4</sub> 0.8M		PEG 8000 1.6%, Glycerin 20%
50	Li-SO <sub>4</sub> 0.4M		PEG 8000 12%, Glycerin 20%

Tabelle 8.6: Sigma Cryo Screen

## 8.4.6. Nextal Classic Suite

Nr	Salz	Puffer	Präzipitans
1	0.01 M Co Cl	0.1 M Na acetat pH 4.6	1.0 M 1,6-Hexandiol
2		0.1 M tri-Na citrat pH 5.6	2.5 M 1,6-Hexandiol
3	0.2 M Mg Cl	0.1 M TRIS pH 8.5	3.4 M 1,6-Hexandiol
4			5 %(v/v) Isopropanol, 2.0 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>
5		0.1 M HEPES Na salt pH 7.5	10 %(v/v) Isopropanol, 20 %(w/v) PEG 4000
6	0.2 M Ca Cl	0.1 M Na acetat pH 4.6	20 %(v/v) Isopropanol
7		0.1 M tri-Na citrat pH 5.6	20 %(v/v) Isopropanol, 20 %(w/v) PEG 4000
8	0.2 M tri-Na citrat	0.1 M HEPES Na salt pH 7.5	20 %(v/v) Isopropanol
9	0.2 M tri-Na citrat	0.1 M Na cacodylat pH 6.5	30 %(v/v) Isopropanol
10	0.2 M Mg Cl	0.1 M HEPES Na salt pH 7.5	30 %(v/v) Isopropanol
11	0.2 M NH <sub>4</sub> acetat	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	30 %(v/v) Isopropanol
12			10 %(v/v) Ethanol, 1.5 M Na Cl
13		0.1 M TRIS pH 8.5	20 %(v/v) Ethanol
14			25 %(v/v) Ethylenglycol
15	0.02 M Ca Cl	0.1 M Na acetat pH 4.6	30 %(v/v) MPD
16	0.2 M Na Cl	0.1 M Na acetat pH 4.6	30 %(v/v) MPD
17	0.2 M NH <sub>4</sub> acetat	0.1 M tri-Na citrat pH 5.6	30 %(v/v) MPD
18	0.2 M Mg acetat	0.1 M Na cacodylat pH 6.5	30 %(v/v) MPD
19	0.2 M tri-Na citrat	0.1 M HEPES Na salt pH 7.5	30 %(v/v) MPD
20	0.5 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	0.1 M HEPES pH 7.5	30 %(v/v) MPD
21	0.2 M NH <sub>4</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 M TRIS pH 8.5	50 %(v/v) MPD
22		0.1 M HEPES pH 7.5	70 %(v/v) MPD
23		0.1 M TRIS pH 8.5	25 %(v/v) tert-Butanol
24		0.1 M tri-Na citrat pH 5.6	35 %(v/v) tert-Butanol
25			0.4 M NH <sub>4</sub> PO <sub>4</sub>
26		0.1 M tri-Na citrat pH 5.6	1.0 M NH <sub>4</sub> PO <sub>4</sub>
27		0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	2.0 M NH <sub>4</sub> PO <sub>4</sub>
28		0.1 M HEPES pH 7.5	2.0 M NH <sub>4</sub> formiat
29		0.1 M Na acetat pH 4.6	2.0 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>
30		0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	2.0 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>
31			2.0 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>
32	0.1 M Na Cl	0.1 M HEPES pH 7.5	1.6 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>
33	0.01 M Co Cl	0.1 M MES pH 6.5	1.8 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>
34	0.2 M K/Na tartrat	0.1 M tri-Na citrat pH 5.6	2.0 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>
35			1.0 M Imidazol pH 7.0
36			0.4 M K/Na tartrat
37		0.1 M HEPES Na salt pH 7.5	0.8 M K/Na tartrat
38		0.1 M Imidazol pH 6.5	1.0 M Na acetat
39	0.05 M Cd SO <sub>4</sub>	0.1 M HEPES pH 7.5	1.0 M Na acetat
40		0.1 M Na cacodylat pH 6.5	1.4 M Na acetat
41		0.1 M Na acetat pH 4.6	2.0 M Na Cl
42	0.1 M Na PO <sub>4</sub> 0.1 M K PO <sub>4</sub>	0.1 M MES pH 6.5	2.0 M Na Cl
43		0.1 M HEPES pH 7.5	4.3 M Na Cl
44		0.1 M HEPES Na salt pH 7.5	1.4 M tri-Na citrate
45			1.6 M tri-Na citrat pH 6.5
46		0.1 M HEPES Na salt pH 7.5	0.8 M Na PO <sub>4</sub>
47			0.8 M K PO <sub>4</sub>
48		0.1 M Na acetat pH 4.6	2.0 M Na formiat
49			4.0 M Na formiat
50		0.1 M BICINE pH 9.0	2 %(v/v) Dioxan, 10 %(w/v) PEG 20000
51		0.1 M MES pH 6.5	10 %(v/v) Dioxan, 1.6 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>
52			35 %(v/v) Dioxan
53	0.5 M Na Cl	0.1 M tri-Na citrat pH 5.6	2 %(v/v) Ethylen imin polymer
		0.1 M TRIS pH 8.5	12 %(v/v) Glycerin

54	0.5 M Na Cl 0.01 M Mg Cl		1.5 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> 0.01 M CTAB
55	0.01 M FeIII Cl	0.1 M tri-Na citrat pH 5.6	10 %(v/v) Jeffamine M-600
56		0.1 M HEPES pH 7.5	20 %(v/v) Jeffamine M-600
57	0.5 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	0.1 M tri-Na citrat pH 5.6	1.0 M Li SO <sub>4</sub>
58	0.01 M Ni Cl	0.1 M TRIS pH 8.5	1.0 M Li SO <sub>4</sub>
59		0.1 M HEPES Na salt pH 7.5	1.5 M Li SO <sub>4</sub>
60		0.1 M BICINE pH 9.0	2.0 M Mg Cl
61			0.2 M Mg formiat
62		0.1 M MES pH 6.5	1.6 M Mg SO <sub>4</sub>
63		0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	8 %(w/v) PEG 8000
64		0.1 M HEPES pH 7.5	10 %(w/v) PEG 8000
65	0.5 M Li SO <sub>4</sub>		15 %(w/v) PEG 8000
66	0.2 M Zi acetat	0.1 M Na cacodylat pH 6.5	18 %(w/v) PEG 8000
67	0.2 M Ca acetat	0.1 M Na cacodylat pH 6.5	18 %(w/v) PEG 8000
68	0.2 M Mg acetat	0.1 M Na cacodylat pH 6.5	20 %(w/v) PEG 8000
69	0.05 M K PO <sub>4</sub>		20 %(w/v) PEG 8000
70	0.2 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	0.1 M Na cacodylat pH 6.5	30 %(w/v) PEG 8000
71	0.2 M Na acetat	0.1 M Na cacodylat pH 6.5	30 %(w/v) PEG 8000
72	0.2 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>		30 %(w/v) PEG 8000
73		0.1 M HEPES Na salt pH 7.5	2 %(v/v) PEG 400, 2.0 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>
74	0.2 M Ca Cl	0.1 M HEPES Na salt pH 7.5	28 %(v/v) PEG 400
75	0.1 M Cd Cl	0.1 M Na acetat pH 4.6	30 %(v/v) PEG 400
76	0.2 M Mg Cl	0.1 M HEPES Na salt pH 7.5	30 %(v/v) PEG 400
77	0.2 M tri-Na citrate	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	30 %(v/v) PEG 400
78	0.1 M Na Cl	0.1 M BICINE pH 9.0	20 %(w/v) PEG 550 MME
79	0.01 M Zi SO <sub>4</sub>	0.1 M MES pH 6.5	25 %(w/v) PEG 550 MME
80			10 %(w/v) PEG 1000, 10 %(w/v) PEG 8000
81			30 %(w/v) PEG 1500
82	0.01 M Ni Cl	0.1 M TRIS pH 8.5	20 %(w/v) PEG 2000 MME
83	0.2 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	0.1 M Na acetat pH 4.6	30 %(w/v) PEG 2000 MME
84		0.1 M Na acetat pH 4.6	8 %(w/v) PEG 4000
85	0.2 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	0.1 M Na acetat pH 4.6	25 %(w/v) PEG 4000
86	0.2 M NH <sub>4</sub> acetat	0.1 M Na acetat pH 4.6	30 %(w/v) PEG 4000
87	0.2 M NH <sub>4</sub> acetat	0.1 M tri-Na citrat pH 5.6	30 %(w/v) PEG 4000
88	0.2 M Mg Cl	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	30 %(w/v) PEG 4000
89	0.2 M Li SO <sub>4</sub>	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	30 %(w/v) PEG 4000
90	0.2 M Na acetat	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	30 %(w/v) PEG 4000
91	0.2 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>		30 %(w/v) PEG 4000
92	0.2 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	0.1 M MES pH 6.5	30 %(w/v) PEG 5000 MME
93		0.1 M HEPES pH 7.5	10 %(w/v) PEG 6000, 5 %(v/v) MPD
94			10 %(w/v) PEG 6000, 2.0 M Na Cl
95		0.1 M HEPES pH 7.5	20 %(w/v) PEG 10000, 8 %(v/v) Ethylenglycol
96		0.1 M MES pH 6.5	12 %(w/v) PEG 20000

Tabelle 8.7: Nextal Classic Suite



## 8.4.7. Nextal Classic Lite Suite

Nr.	Salz	Puffer	Präzipitans
1	0.01 M Co Cl	0.1 M Na acetat pH 4.6	0.5 M 1,6-Hexandiol
2		0.1 M tri-Na citrat pH 5.6	1.25 M 1,6-Hexandiol
3	0.2 M Mg Cl	0.1 M TRIS pH 8.5	1.7 M 1,6-Hexandiol
4			2.5 %(v/v) Isopropanol, 1.0 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>
5		0.1 M HEPES Na salt pH 7.5	5 %(v/v) Isopropanol, 10 %(w/v) PEG 4000
6	0.2 M Ca Cl	0.1 M Na acetat pH 4.6	10 %(v/v) Isopropanol
7		0.1 M tri-Na citrat pH 5.6	10 %(v/v) Isopropanol, 10 %(w/v) PEG 4000
8	0.2 M tri-Na citrat	0.1 M HEPES Na salt pH 7.5	10 %(v/v) Isopropanol
9	0.2 M tri-Na citrat	0.1 M Na cacodylat pH 6.5	15 %(v/v) Isopropanol
10	0.2 M Mg Cl	0.1 M HEPES Na salt pH 7.5	15 %(v/v) Isopropanol
11	0.2 M NH <sub>4</sub> acetat	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	15 %(v/v) Isopropanol
12			5 %(v/v) Ethanol, 0.75 M Na Cl
13		0.1 M TRIS pH 8.5	10 %(v/v) Ethanol
14			12.5 %(v/v) Ethylenglycol
15	0.02 M Ca Cl	0.1 M Na acetat pH 4.6	15 %(v/v) MPD
16	0.2 M Na Cl	0.1 M Na acetat pH 4.6	15 %(v/v) MPD
17	0.2 M NH <sub>4</sub> acetat	0.1 M tri-Na citrat pH 5.6	15 %(v/v) MPD
18	0.2 M Mg acetat	0.1 M Na cacodylat pH 6.5	15 %(v/v) MPD
19	0.2 M tri-Na citrat	0.1 M HEPES Na salt pH 7.5	15 %(v/v) MPD
20	0.5 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	0.1 M HEPES pH 7.5	15 %(v/v) MPD
21	0.2 M NH <sub>4</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 M TRIS pH 8.5	25 %(v/v) MPD
22		0.1 M HEPES pH 7.5	35 %(v/v) MPD
23		0.1 M TRIS pH 8.5	12.5 %(v/v) tert-Butanol
24		0.1 M tri-Na citrat pH 5.6	17.5 %(v/v) tert-Butanol
25			0.2 M NH <sub>4</sub> PO <sub>4</sub>
26		0.1 M tri-Na citrat pH 5.6	0.5 M NH <sub>4</sub> PO <sub>4</sub>
27		0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.0 M NH <sub>4</sub> PO <sub>4</sub>
28		0.1 M HEPES pH 7.5	1.0 M NH <sub>4</sub> formiat
29		0.1 M Na acetat pH 4.6	1.0 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>
30		0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.0 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>
31			1.0 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>
32	0.1 M Na Cl	0.1 M HEPES pH 7.5	0.8 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>
33	0.01 M Co Cl	0.1 M MES pH 6.5	0.9 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>
34	0.2 M K/Na tartrat	0.1 M tri-Na citrat pH 5.6	1 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>
35			0.5 M Imidazol pH 7.0
36			0.2 M K/Na tartrat
37		0.1 M HEPES Na salt pH 7.5	0.4 M K/Na tartrat
38		0.1 M Imidazol pH 6.5	0.5 M Na acetat
39	0.05 M Cd SO <sub>4</sub>	0.1 M HEPES pH 7.5	0.5 M Na acetat
40		0.1 M Na cacodylat pH 6.5	0.7 M Na acetat
41		0.1 M Na acetat pH 4.6	1.0 M Na Cl
42	0.1 M Na PO <sub>4</sub> 0.1 M K PO <sub>4</sub>	0.1 M MES pH 6.5	1.0 M Na Cl
43		0.1 M HEPES pH 7.5	2.15 M Na Cl
44		0.1 M HEPES Na salt pH 7.5	0.7 M tri-Na citrate
45			0.8 M tri-Na citrat pH 6.5
46		0.1 M HEPES Na salt pH 7.5	0.4 M Na PO <sub>4</sub>
47			0.4 M K PO <sub>4</sub>
48		0.1 M Na acetat pH 4.6	1.0 M Na formiat
49			2.0 M Na formiat
50		0.1 M BICINE pH 9.0	1 %(v/v) Dioxan, 5 %(w/v) PEG 20000
51		0.1 M MES pH 6.5	5 %(v/v) Dioxan, 0.8 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>
52	0.5 M Na Cl	0.1 M tri-Na citrat pH 5.6	17.5 %(v/v) Dioxan 1 %(v/v) Ethylen imin polymer

53		0.1 M TRIS pH 8.5	6 %(v/v) Glycerin
54	0.25 M Na Cl		0.75 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>
	0.005 M Mg Cl		0.01 M CTAB
55	0.01 M FeIII Cl	0.1 M tri-Na citrat pH 5.6	5 %(v/v) Jeffamine M-600
56		0.1 M HEPES pH 7.5	10 %(v/v) Jeffamine M-600
57	0.5 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	0.1 M tri-Na citrat pH 5.6	0.5 M Li SO <sub>4</sub>
58	0.01 M Ni Cl	0.1 M TRIS pH 8.5	0.5 M Li SO <sub>4</sub>
59		0.1 M HEPES Na salt pH 7.5	0.75 M Li SO <sub>4</sub>
60		0.1 M BICINE pH 9.0	1.0 M Mg Cl
61			0.1 M Mg formiat
62		0.1 M MES pH 6.5	0.8 M Mg SO <sub>4</sub>
63		0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	4 %(w/v) PEG 8000
64		0.1 M HEPES pH 7.5	5 %(w/v) PEG 8000
65	0.5 M Li SO <sub>4</sub>		7.5 %(w/v) PEG 8000
66	0.2 M Zi acetat	0.1 M Na cacodylat pH 6.5	9 %(w/v) PEG 8000
67	0.2 M Ca acetat	0.1 M Na cacodylat pH 6.5	9 %(w/v) PEG 8000
68	0.2 M Mg acetat	0.1 M Na cacodylat pH 6.5	10 %(w/v) PEG 8000
69	0.05 M K PO <sub>4</sub>		10 %(w/v) PEG 8000
70	0.2 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	0.1 M Na cacodylat pH 6.5	15 %(w/v) PEG 8000
71	0.2 M Na acetat	0.1 M Na cacodylat pH 6.5	15 %(w/v) PEG 8000
72	0.2 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>		15 %(w/v) PEG 8000
73		0.1 M HEPES Na salt pH 7.5	1 %(v/v) PEG 400, 1.0 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>
74	0.2 M Ca Cl	0.1 M HEPES Na salt pH 7.5	14 %(v/v) PEG 400
75	0.1 M Cd Cl	0.1 M Na acetat pH 4.6	15 %(v/v) PEG 400
76	0.2 M Mg Cl	0.1 M HEPES Na salt pH 7.5	15 %(v/v) PEG 400
77	0.2 M tri-Na citrate	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	15 %(v/v) PEG 400
78	0.1 M Na Cl	0.1 M BICINE pH 9.0	10 %(w/v) PEG 550 MME
79	0.01 M Zi SO <sub>4</sub>	0.1 M MES pH 6.5	12.5 %(w/v) PEG 550 MME
80			5 %(w/v) PEG 1000, 5 %(w/v) PEG 8000
81			15 %(w/v) PEG 1500
82	0.01 M Ni Cl	0.1 M TRIS pH 8.5	10 %(w/v) PEG 2000 MME
83	0.2 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	0.1 M Na acetat pH 4.6	15 %(w/v) PEG 2000 MME
84		0.1 M Na acetat pH 4.6	4 %(w/v) PEG 4000
85	0.2 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	0.1 M Na acetat pH 4.6	12.5 %(w/v) PEG 4000
86	0.2 M NH <sub>4</sub> acetat	0.1 M Na acetat pH 4.6	15 %(w/v) PEG 4000
87	0.2 M NH <sub>4</sub> acetat	0.1 M tri-Nacitrat pH 5.6	15 %(w/v) PEG 4000
88	0.2 M Mg Cl	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	15 %(w/v) PEG 4000
89	0.2 M Li SO <sub>4</sub>	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	15 %(w/v) PEG 4000
90	0.2 M Na acetat	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	15 %(w/v) PEG 4000
91	0.2 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>		15 %(w/v) PEG 4000
92	0.2 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	0.1 M MES pH 6.5	15 %(w/v) PEG 5000 MME
93		0.1 M HEPES pH 7.5	5 %(w/v) PEG 6000, 2.5 %(v/v) MPD
94			5 %(w/v) PEG 6000, 1.0 M Na Cl
95		0.1 M HEPES pH 7.5	10 %(w/v) PEG 10000, 4 %(v/v) Ethylenglycol
96		0.1 M MES pH 6.5	6 %(w/v) PEG 20000

Tabelle 8.8: Nextal Classic Lite Suite

## 8.4.8. Nextal Anions Suite

Nr.	Puffer	Präzipitans
1	0.1 M Na acetat pH 4.6	2.5 M Na acetat
2	0.1 M Na acetat pH 4.6	1.25 M Na acetat
3	0.1 M Na acetat pH 4.6	1.2 M tri-Na citrate
4	0.1 M Na acetat pH 4.6	0.6 M tri-Na citrate
5	0.1 M Na acetat pH 4.6	0.6 M Na F
6	0.1 M Na acetat pH 4.6	0.3 M Na F
7	0.1 M MES pH 6.5	2.5 M Na acetat
8	0.1 M MES pH 6.5	1.25 M Na acetat
9	0.1 M MES pH 6.5	1.2 M tri-Na citrate
10	0.1 M MES pH 6.5	0.6 M tri-Na citrate
11	0.1 M MES pH 6.5	0.6 M Na F
12	0.1 M MES pH 6.5	0.3 M Na F
13	0.1 M HEPES pH 7.5	2.5 M Na acetat
14	0.1 M HEPES pH 7.5	1.25 M Na acetat
15	0.1 M HEPES pH 7.5	1.2 M tri-Na citrate
16	0.1 M HEPES pH 7.5	0.6 M tri-Na citrate
17	0.1 M HEPES pH 7.5	0.6 M Na F
18	0.1 M HEPES pH 7.5	0.3 M Na F
19	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	2.5 M Na acetat
20	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.25 M Na acetat
21	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.2 M tri-Na citrate
22	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	0.6 M tri-Na citrate
23	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	0.6 M Na F
24	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	0.3 M Na F
25	0.1 M Na acetat pH 4.6	3.5 M Na F
26	0.1 M Na acetat pH 4.6	1.75 M Na F
27	0.1 M Na acetat pH 4.6	3.5 M Na Br
28	0.1 M Na acetat pH 4.6	1.75 M Na Br
29	0.1 M Na acetat pH 4.6	2.4 M Na malonate
30	0.1 M Na acetat pH 4.6	1.2 M Na malonate
31	0.1 M MES pH 6.5	3.5 M Na formiat
32	0.1 M MES pH 6.5	1.75 M Na formiat
33	0.1 M MES pH 6.5	3.5 M NaBr
34	0.1 M MES pH 6.5	1.75 M Na Br
35	0.1 M MES pH 6.5	2.4 M Na malonate
36	0.1 M MES pH 6.5	1.2 M Na malonate
37	0.1 M HEPES pH 7.5	3.5 M Na formiat
38	0.1 M HEPES pH 7.5	1.75 M Na formiat
39	0.1 M HEPES pH 7.5	3.5 M Na Br
40	0.1 M HEPES pH 7.5	1.75 M Na Br
41	0.1 M HEPES pH 7.5	2.4 M Na malonate
42	0.1 M HEPES pH 7.5	1.2 M Na malonate
43	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	3.5 M Na formiat
44	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.75 M Na formiat
45	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	3.5 M NaBr
46	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.75 M Na Br
47	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	2.4 M Na malonate
48	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.2 M Na malonate
49	0.1 M Na acetat pH 4.6	3.5 M Na NO <sub>3</sub>
50	0.1 M Na acetat pH 4.6	1.75 M Na NO <sub>3</sub>
51	0.1 M Na acetat pH 4.6	0.9 M Na PO <sub>4</sub> , 0.9 K PO <sub>4</sub>
52	0.1 M Na acetat pH 4.6	0.45 M Na PO <sub>4</sub> 0.45 K PO <sub>4</sub>
53	0.1 M Na acetat pH 4.6	1.0 M Na succinate
54	0.1 M Na acetat pH 4.6	0.5 M Na succinate

55	0.1 M MES pH 6.5	3.5 M Na NO <sub>3</sub>
56	0.1 M MES pH 6.5	1.75 M Na NO <sub>3</sub>
57	0.1 M MES pH 6.5	0.9 M Na PO <sub>4</sub> , 0.9 K PO <sub>4</sub>
58	0.1 M MES pH 6.5	0.45 M Na PO <sub>4</sub> 0.45 K PO <sub>4</sub>
59	0.1 M MES pH 6.5	1.0 M Na succinate
60	0.1 M MES pH 6.5	0.5 M Na succinate
61	0.1 M HEPES pH 7.5	3.5 M Na NO <sub>3</sub>
62	0.1 M HEPES pH 7.5	1.75 M Na NO <sub>3</sub>
63	0.1 M HEPES pH 7.5	0.9 M Na PO <sub>4</sub> , 0.9 K PO <sub>4</sub>
64	0.1 M HEPES pH 7.5	0.45 M Na PO <sub>4</sub> 0.45 K PO <sub>4</sub>
65	0.1 M HEPES pH 7.5	1.0 M Na succinate
66	0.1 M HEPES pH 7.5	0.5 M Na succinate
67	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	3.5 M Na NO <sub>3</sub>
68	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.75 M NaNO <sub>3</sub>
69	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	0.9 M Na PO <sub>4</sub> , 0.9 K PO <sub>4</sub>
70	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	0.45 M Na PO <sub>4</sub> 0.45 K PO <sub>4</sub>
71	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.0 M Na succinate
72	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	0.5 M Na succinate
73	0.1 M Na acetat pH 4.6	0.75 M Na SO <sub>4</sub>
74	0.1 M Na acetat pH 4.6	0.37 M Na SO <sub>4</sub>
75	0.1 M Na tartrat pH 5.6	1.2 M K/Na tartrat
76	0.1 M Na tartrat pH 5.6	0.6 M K/Na tartrat
77	0.1 M Na acetat pH 4.6	2.4 M Na SCN
78	0.1 M Na acetat pH 4.6	1.2 M Na SCN
79	0.1 M MES pH 6.5	0.75 M Na SO <sub>4</sub>
80	0.1 M MES pH 6.5	0.37 M Na SO <sub>4</sub>
81	0.1 M MES pH 6.5	1.2 M K/Na tartrat
82	0.1 M MES pH 6.5	0.6 M K/Na tartrat
83	0.1 M MES pH 6.5	2.4 M Na SCN
84	0.1 M MES pH 6.5	1.2 M Na SCN
85	0.1 M HEPES pH 7.5	0.75 M Na SO <sub>4</sub>
86	0.1 M HEPES pH 7.5	0.37 M Na SO <sub>4</sub>
87	0.1 M HEPES pH 7.5	1.2 M K/Na tartrat
88	0.1 M HEPES pH 7.5	0.6 M K/Na tartrat
89	0.1 M HEPES pH 7.5	2.4 M Na SCN
90	0.1 M HEPES pH 7.5	1.2 M Na SCN
91	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	0.75 M Na SO <sub>4</sub>
92	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	0.37 M Na SO <sub>4</sub>
93	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.2 M K/Na tartrat
94	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	0.6 M K/Na tartrat
95	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	2.4 M Na SCN
96	0.1 M TRIS.HCl pH 8.5	1.2 M Na SCN

Tabelle 8.9: Nextal Anions Suite